

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Farmacología



TESIS DOCTORAL

**Estudio del papel de TLR4 en la transformación hemorrágica e
infiltración aguda tras ictus experimental**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alicia García Culebras

Directores

**Ignacio Lizasoain Hernández
María Ángeles Moro Sánchez
Ana Moraga Yébenes**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica



**Estudio del papel de TLR4 en la transformación hemorrágica e
infiltración aguda tras ictus experimental**

TESIS DOCTORAL

ALICIA GARCÍA CULEBRAS

Directores de Tesis

**Ignacio Lizasoain Hernández
María Ángeles Moro Sánchez
Ana Moraga Yébenes**

Madrid, 2017

Estudio del papel de TLR4 en la transformación hemorrágica e infiltración aguda tras ictus experimental



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica

Directores de Tesis:
Ignacio Lizasoain Hernández
María Ángeles Moro Sánchez
Ana Moraga Yébenes

Alicia García Culebras
Madrid, 2017

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	11
SUMMARY.....	19
INTRODUCCIÓN.....	27
1. LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR.....	29
1.1. DEFINICIÓN.....	29
1.2. CLASIFICACIÓN.....	29
A) ICTUS HEMORRÁGICO.....	29
B) ICTUS ISQUÉMICO.....	30
1.3. EPIDEMIOLOGÍA.....	31
1.3.1. El ictus en la sociedad.....	31
1.3.2. Factores de riesgo.....	32
2. FISIOPATOLOGÍA DEL ICTUS ISQUÉMICO	32
2.1. ISQUEMIA CEREBRAL: DEFINICION DE CORE Y PENUMBRA.....	32
2.2. LA CASCADA ISQUÉMICA.....	34
2.3. INFLAMACIÓN.....	37
2.4. RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN Y REPARACIÓN DEL TEJIDO.....	40
3. TRATAMIENTO DEL ICTUS ISQUÉMICO.....	41
3.1. EL FRACASO DE LA “NEUROPROTECCIÓN” EN LA FASE AGUDA DEL ICTUS.....	42
3.2. TERAPIA TROMBOLÍTICA.....	43
3.3. TROMBECTOMÍA MECÁNICA.....	47
4. TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA.....	47
4.1. LA IMPORTANCIA DE LA BHE EN EL PROCESO DE TH.....	48
4.2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA.....	50

4.2.1. Alteración de la BHE por estrés oxidativo.....	51
4.2.2. Alteración de la BHE por proteólisis.....	52
4.2.3. Alteración de la BHE por infiltración leucocitaria.....	54
4.3. TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA EN LA ISQUEMIA EXPERIMENTAL.....	55
5. LA RESPUESTA INMUNE EN EL ICTUS.....	57
5.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE.....	57
5.1.1. Activación de las células residentes: la microglía.....	58
5.1.2. Infiltración de monocitos/macrófagos.....	59
5.1.3. Infiltración de neutrófilos.....	63
5.1.4. Infiltración de linfocitos.....	68
5.2. MEDIADORES MOLECULARES DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA: “RECEPTORES TOLL-LIKE”.....	69
5.2.1. Origen, estructura y ligandos.....	69
5.2.2. Rutas de señalización de los TLRs.....	73
5.2.3. Localización de TLR4 en el SNC.....	77
5.2.4. Funciones generales fisiopatológicas del receptor TLR4 en el SNC.....	78
A) Señalización de TLR4 y neurotransmisión.....	78
B) TLR4 y neuroinflamación en condiciones patológicas del SNC.....	79
5.2.5. TLR4 en el daño agudo por ictus.....	79
5.3. LA INMUNIDAD ADQUIRIDA EN LA ISQUEMIA CEREBRAL.....	81
<u>JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</u>	<u>85</u>
1. JUSTIFICACIÓN.....	87
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	87

MATERIAL Y MÉTODOS.....	91
1. TÉCNICAS IN VIVO.....	93
1.1. ANIMALES.....	93
1.2. MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA FOCAL PERMANENTE MEDIANTE LIGADURA DE LA ARTERIA CEREBRAL MEDIA.....	94
1.3. MODELO TROMBOEMBÓLICO IN SITU.....	95
1.4. EXTRACCIONES SANGUÍNEAS y MEDIDA DE LOS PARÁMETROS SANGUÍNEOS.....	99
1.5. ELIMINACIÓN DE NEUTRÓFILOS.....	99
1.6. EVALUACIÓN DE LOS DÉFICITS NEUROLÓGICOS.....	100
2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES Y DETERMINACIONES.....	101
2.1. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	101
2.1.1. Preparación del tejido para estudios histológicos y de inmunofluorescencia.....	101
2.1.2. Preparación del tejido y marcaje de muestras para estudios de citometría de flujo.....	103
2.1.3. Preparación del tejido para aislamiento de neutrófilos y análisis genómico.....	105
2.1.4. Extracción de ARN.....	106
2.1.5. Análisis de expresión génica global con microarray.....	106
2.2. DETERMINACIONES.....	107
2.2.1. Cálculo del volumen de infarto.....	107
2.2.2. Clasificación macroscópica de la hemorragia.....	108
2.2.3. Medida del área hemorrágica.....	109
2.2.4. Cuantificación celular por estereología.....	110
2.2.5. Cuantificación de la extravasación de IgG.....	111
2.2.6. Análisis por citometría de flujo.....	111

2.2.7. Análisis bioinformático de la expresión génica global con microarrays....	117
2.2.8. Estadística.....	118
3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y PROTOCOLO.....	118
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL BLOQUE I.....	118
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL BLOQUE II.....	119
3.2.1. Grupo Experimental I: Evaluación de la implicación del receptor TLR4 en la infiltración de células y la polarización de neutrófilos tras MCAO...	120
3.2.2. Grupo Experimental II: Protocolo de eliminación de neutrófilos.....	121
3.2.3 Grupo Experimental I II: Evaluación del receptor TLR4 de células mieloides y de plaquetas en el volumen de infarto, la infiltración, y la polarización de neutrófilos tras isquemia experimental.....	121
RESULTADOS.....	123
1. ESTUDIO DEL EFECTO DEL RECEPTOR TLR4 EN EL FENÓMENO DE TH.....	123
1.1. MODELO TROMBOEMBOLICO IN SITU: PORCENTAJES DE SUPERVIVENCIA Y ÉXITO.....	123
1.2. EFECTO DE TLR4 Y DE LA REPERFUSIÓN SOBRE EL VOLUMEN DE INFARTO.....	127
1.3. EFECTO DE TLR4 Y DE LA REPERFUSIÓN EN LA TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA.....	129
1.4. EFECTO DE TLR4 EN EL DAÑO A LA BHE, EN LA INFILTRACIÓN DE LEUCOCITOS Y EN LA EXPRESIÓN DE MMP9 TRAS LA ADMINISTRACIÓN TARDÍA DE T-PA.....	132
2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL RECEPTOR TLR4 EN LA INFILTRACIÓN AGUDA TRAS ICTUS.....	137
2.1. EFECTO DE TLR4 EN LA INFILTRACIÓN CELULAR.....	137
2.1.1. Infiltración de MDMs Ly6C ^{hi}	137
2.1.2. Infiltración de neutrófilos.....	138
2.1.3. La microglía residente.....	140
2.2. EFECTO DE TLR4 EN LA RESPUESTA CIRCULANTE PERIFÉRICA.....	141
2.2.1. Monocitos circulantes.....	141

2.2.2. Neutrófilos circulantes.....	142
2.2.3. Linfocitos circulantes.....	143
2.3. EFECTO DE TLR4 EN LA MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS DE LA MÉDULA ÓSEA TRAS ISQUEMIA.....	144
2.3.1. Monocitos de la médula ósea.....	144
2.3.2. Neutrófilos de la médula ósea.....	144
2.3.3. Linfocitos de la médula ósea.....	145
2.4. EFECTO DE TLR4 EN LA INFILTRACIÓN DE NEUTRÓFILOS.....	146
2.5. EFECTO DE TLR4 EN EL VOLUMEN DE INFARTO TRAS LA ELIMINACIÓN DE NEUTRÓFILOS.....	148
2.6. EFECTO DEL RECEPTOR TLR4 EN EL FENOTIPO DE NEUTRÓFILOS TRAS ISQUEMIA.....	150
2.7. PAPEL DEL RECEPTOR TLR4 DE PLAQUETAS Y CÉLULAS MIELOIDES TRAS ISQUEMIA.....	154
2.8. CARACTERIZACIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS N2 EN ISQUEMIA EXPERIMENTAL.....	156
DISCUSIÓN.....	165
1. EFECTO DE TLR4 EN EL FENÓMENO DE TH.....	167
2. EFECTO DE TLR4 EN LA INFILTRACIÓN AGUDA TRAS ICTUS.....	173
2.1. TLR4 COMO MEDIADOR DEL DAÑO ISQUÉMICO.....	173
2.2. PAPEL DE TLR4 EN LA MICROGLÍA.....	174
2.3. PAPEL PERIFÉRICO DE TLR4.....	176
2.4. PAPEL DE TLR4 EN EL FENOTIPO DE NEUTRÓFILOS.....	180
2.5. PAPEL DE TLR4 DE PLAQUETAS Y CÉLULAS MIELOIDES.....	183
2.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS N2 EN ISQUEMIA EXPERIMENTAL.....	185
CONCLUSIONES.....	189

CONCLUSIONS.....	193
BIBLIOGRAFÍA.....	197
ANEXO.....	219

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AAE: Aminoácidos excitatorios

ACM: Arteria Cerebral Media

AIT: Ataque Isquémico Transitorio

AMPA: 2-amino-3-(hidroxi-5-metil-5-metili soxazol-4-il) propionato

ANOVA: Análisis de la Varianza

AP-1: Proteína Adaptadora 1

APCs: Células presentadoras de antígenos

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero

ATLANTIS: Alteplase thrombolysis for acute noninterventional therapy in ischemic stroke

ATP: Adenosín Trifosfato

AKT: Serina-treonina-quinasa

BDNF: Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*)

BHE: Barrera Hematoencefálica

Ca²⁺: Calcio

CCL: citoquina leucocitaria

CCR2: Receptor de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1)

CD: Célula dendrítica

CD(número): Cluster de diferenciación

CO₂: Dióxido de Carbono

COX2: Ciclooxygenasa tipo 2

CXCR2: Receptor de quimioquina C-X-C tipo 2

CXCR4: Receptor de quimioquina C-X-C tipo 4

DAB: Diaminobencidina

DAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Daño (*Damage Associated Molecular Patterns*)

ECs: células endoteliales

ECASS: European cooperative acute stroke study

ECV: Enfermedad Cerebrovascular

EDTA:Ácido Etilendiaminotetraacético

EEUU: Estados Unidos de América

EMA: *European Medicines Agency*

ERK: Quinasa activada por señales extracelulares

ERNs: Especies Reactivas de Nitrógeno

EROs: Especies Reactivas de Oxígeno

EtOH: Etanol

FDA: *Food and Drug Administration*

FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos (*Fibroblast Growth Factors*)

FITC: Isocianato de fluoresceína

FSC: *Forward Scatter*

HI: Hemisferio infartado

HMGB1: Proteína de Alta Movilidad del Grupo Box-1 (*High Mobility Group Box1*)

HSP60: Proteína de Choque Térmico 60 (*Heat-Shock Protein 60*)

HSP70: Proteína de Choque Térmico 70 (*Heat-Shock Protein 70*)

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1.

IDO: Indoleamina-2,3-dioxigenasa

IFN: Interferón

IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1

IgG: Inmunoglobulina G

IκB: inhibidor de la kappa B

IL: Interleuquina

iNOS: Óxido Nítrico Sintasa inducible

I.p.: Intraperitoneal

IRF: Factor Regulador de Interferón (*Interferon Regulatory Factor*)

IRM: Imagen de Resonancia Magnética

JAMs: junction adhesion molecules

LBP: Proteína de Unión al Lipopolisacárido (*Lipopolysaccharide-Binding Protein*)

LFA1: Antígeno asociado a función linfocitaria 1

LPS: Lipopolisacárido

LRP-1: Receptor de la lipoproteína de baja densidad 1.

LTP: Potenciación a largo plazo

Ly6C: Antígeno del complejo linfocitario 6 (locus C1)

Ly6G: Antígeno del complejo linfocitario 6 (locus G)

Mac1: Antígeno 1 del macrófago

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógeno

MBP: Proteína básica de mielina

MCAO: Oclusión de la arteria cerebral media.

MCP-1: Proteína Quimioatrayente de Monocitos-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*)

MD-2: Factor de Diferenciación Mieloide-2

MEC: Matriz Extracelular

MMP: Metaloproteasa de Matriz

MyD88: Factor de Diferenciación Mieloide 88 (*Myeloid Differentiation Factor 88*)

NADPH: Nicotina adenina dinucleótido

NETs: trampa extracelular neutrofílica (*Neutrophil extracellular traps*)

NeuN: Núcleo de Neuronas (*Neuronal Nuclei*)

NF-κB: Factor nuclear- κB

NINDS: *National Institute of Neurological Disorders and Stroke*

NK: *Natural Killer*

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa (*Nitric oxide sintase*)

O₂: Oxígeno

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAI: Inhibidor del activador del plasminógeno

PAM: Presión arterial media

PAMP: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

PAs: Proteinasas

PBS: Tampón Fosfato Salino

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

PET: Tomografía de Emisión de Positrones (Positron Emission Tomography)

PFA: Para-formaldehído

PIP₂: Fosfatidil-inositol Difosfato

PIP₃: Fosfatidil-inositol Trifosfato

MCAO: Oclusión de la Arteria Cerebral Media (Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion)

PE: Ficoeritrina

PercP: Proteína peridinin clorofila

PMNs: Leucocitos polimorfonucleares

PRR - Receptores de Reconocimiento de Patrones

PSGL-1: Ligando de P-selectina

RAGE: Receptor for Advanced Glycation Endproducts

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

r-Tpa: Activador Tisular del Plasminógeno Recombinante

SNC: Sistema Nervioso Central

SSC: Side Scatter

STAIR: Stroke Treatment Academic Industry Roundtable

STAT: Proteína transductora de señal y activadora de la transcripción

TAB

TAK-1: Quinasa activada por el mitógeno 7

Tampón TE: Tampón Tris-EDTA

TBI: lesión cerebral traumática

Tc: Célula T (T cell).

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β

Th: T helper

TH: Transformación hemorrágica

TIR: Dominio del Receptor Toll/IL (Toll/IL Receptor domain)

TIRAP: Proteína Asociada al Receptor Toll/IL (Toll/IL Receptor-Associated Protein)

TLR: Receptores Toll-like (Toll-like Receptors)

TM: Trombectomía mecánica

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral α (Tumor Necrosis Factor- α)

TOAST: Trial of ORG 10172 in acute stroke treatment

TRAF: Factor Asociado al Receptor de TNF (TNFR Associated-Factor)

TRAM: Molécula Adaptadora Relacionada con TRIF (TRIF-Related Adaptor Molecule)

Triad3A: E3 ubiquitina-proteína ligasa reguladora de TLRs

TRIF: Factor Derivado de Interferón asociado al Receptor Toll (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β)

UNV: Unidad neurovascular

VCAM-1: Molécula de Adhesión Vascular-1 (*Vascular Cell Adhesion Protein 1*)

VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

VLA-4: Antígeno 4 muy tardío (Integrina $\alpha 4\beta 1$)

WT: Fenotipo salvaje (*Wild type*)

Ym1: Alias Chitinase-3-like protein 3

ZSG: Zona subgranular

ZSV: Zona subventricular

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

En los países occidentales, el ictus es la segunda causa de muerte (primera causa entre mujeres en España), la segunda causa de demencia, y la principal causa de discapacidad grave entre los adultos. A pesar de estos datos, las únicas aproximaciones terapéuticas consisten en la recanalización de las arterias obstruidas mediante el tratamiento fibrinolítico a través del activador del plasminógeno tisular (t-PA) (sólo útil entre el 5-10% de los pacientes), o la trombectomía endovascular (Goyal et al., 2016; Hacke et al., 1995). Por ello, es necesario el desarrollo de nuevas terapias neuroprotectoras para el tratamiento en fase aguda de esta patología.

Por un lado, el tratamiento con t-PA es utilizado en condiciones muy restrictivas para evitar el fenómeno de transformación hemorrágica (TH), que es la principal complicación de la trombólisis. Dado que la TH, también es una grave complicación después de la trombectomía mecánica (Goyal et al., 2016) se hace necesario la investigación en los mecanismos de TH y en las terapias potenciales que podrían reducir el riesgo de sufrirla, mejorando el pronóstico de los pacientes con esta enfermedad.

Además, la aparición de un ictus isquémico, conlleva una cascada de eventos inflamatorios (cascada isquémica) que se inicia en la microvasculatura cerebral, donde el estrés oxidativo y las especies reactivas de oxígeno inducen la activación del sistema del complemento, las plaquetas y las células endoteliales (para revisión ver (Iadecola and Anrather, 2011)). A su vez, a nivel perivascular y del parénquima se produce una respuesta inmune innata que pone en marcha una fuerte respuesta inflamatoria. Uno de los principales tipos celulares responsables de la respuesta cerebral es la microglía, que participa en esta respuesta mediante la producción de mediadores inflamatorios, en gran medida gracias a la señalización intracelular que se pone en marcha tras la activación de los receptores toll-like (TLR).

Los TLR pertenecen a una familia de receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR) que están relacionados con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o a daño celular (DAMPs). Una vez reconocido el

ligando, los TLRs producen mediadores inflamatorios a través de rutas de señalización intracelulares.

Aunque las funciones fisiológicas de los TLRs no están bien exploradas, se ha descrito su participación en procesos como la isquemia cerebral y la hemorragia intracerebral (Teng et al., 2009). En el contexto de las hemorragias, una de las principales causas es una mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) (Lo, 2008), como consecuencia de la pérdida de diferentes componentes de la lámina basal, y relacionada con una mayor expresión de MMP-9 que tiene lugar tras la isquemia (Rosenberg et al., 1998). Se ha demostrado que la MMP-9 está regulada por HMGB1 a través del receptor TLR4 (Qiu et al., 2010) lo que relaciona TLR4 con el proceso de TH. En los seres humanos, los niveles séricos de MMP-9 predicen TH en la enfermedad cerebrovascular aguda (Castellanos et al., 2003) y los de HMGB1, un ligando de TLR4, se correlacionan con la gravedad de esta enfermedad (Yang et al., 2010).

Por otro lado, y con respecto a la isquemia cerebral, se sabe que TLR4 tiene un importante papel en la inducción de la respuesta inflamatoria y en la producción del daño tisular (Caso et al., 2007). De hecho, hay distintas evidencias experimentales que demuestran que la deficiencia no sólo de TLR4 sino también de TLR2 atenúa significativamente el daño cerebral isquémico (Cao et al., 2007; Caso et al., 2007; Tang et al., 2007). Se ha descrito que los ratones deficientes en TLR4 tienen una menor expresión de mediadores inflamatorios en un contexto de daño cerebral (Caso et al., 2007). Por otra parte, se ha visto que TLR4 participa en los procesos de preconditionamiento isquémico, en los que isquemias subletales inducen protección (tolerancia) frente a una isquemia grave posterior (Pradillo et al., 2009). Sin embargo, la implicación periférica de TLR4 en el ictus no está bien explorada. Concretamente, el efecto del receptor TLR4 en las células circulantes derivadas de la médula ósea se exploró en un estudio realizado en 2011 con animales deficientes en este receptor (Yang et al., 2011). En este trabajo, se demostró que la expresión de TLR4 en las células inmunes periféricas participa en el daño isquémico en modelos experimentales de ictus: cuando a los ratones con un fenotipo salvaje para TLR4 o wild type se les eliminan estas células por irradiación y, posteriormente,

se les introducen las poblaciones de la médula ósea de un ratón carente del receptor, el volumen de infarto disminuye. Por el contrario, si se irradian ratones deficientes para TLR4 y se lleva a cabo la transferencia adoptiva de células de la médula de los ratones que, si presentaban el receptor, el volumen de infarto aumenta.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A partir de los antecedentes citados, establecimos las siguientes **hipótesis**:

- La activación del receptor TLR4 puede participar en el desarrollo de la transformación hemorrágica asociada a la administración tardía de t-PA.
- El TLR4 puede jugar un importante papel a nivel periférico afectando la función de poblaciones leucocitarias tras ictus experimental.

Con objeto de demostrar estas hipótesis se plantearon los siguientes **objetivos**:

- Estudio del efecto del receptor TLR4 en el fenómeno de transformación hemorrágica.
- Estudio del efecto del receptor TLR4 en la infiltración leucocitaria aguda tras ictus.

3. MÉTODOS

Para todos los **procedimientos experimentales**, utilizamos ratones C57BL/10ScNJ que no expresan TLR4 (TLR4^{-/-}) por una delección natural del gen; y C57BL/10J que expresa el receptor de forma normal (TLR4^{+/+}). Los grupos de edad de los animales fueron: adultos jóvenes (2-3 meses). El modelo experimental para la inducción de la isquemia focal permanente, para el primer objetivo, fue el modelo tromboembólico *in situ* (Orset et al., 2007), con administración temprana y tardía de t-PA para recanalizar la arteria (García-Yébenes et al., 2011); para el segundo objetivo se realizó la oclusión de la arteria cerebral media (ACM) mediante una ligadura por debajo de la bifurcación de su tronco (modificado de (Chen et al., 1986)).

4. RESULTADOS

Los **resultados obtenidos respecto al primer objetivo** muestran que el receptor TLR4 está implicado en el daño en un modelo experimental tromboembólico *in situ*, ya que los animales TLR4^{+/-} presentaron un volumen de infarto superior a los TLR4^{-/-}. En estos animales, la expresión de TLR4 se identificó principalmente en neuronas mediante técnicas de inmunofluorescencia. Por otro lado, demostramos la participación de TLR4 en el proceso de TH tras reperusión tardía de la ACM, puesto que observamos una mayor gravedad de la hemorragia y del área de sangrado en los animales TLR4^{+/-} cuando se comparan con los animales que carecen del receptor. Al estudiar la integridad de la BHE de estos grupos experimentales de reperusión tardía mediante el marcaje por inmunofluorescencia de la inmunoglobulina G, observamos que los animales TLR4^{+/-} presentan una mayor extravasación de esta proteína en el área dañada, lo que indica un mayor daño en la BHE. Finalmente, estudiamos la infiltración de neutrófilos y los niveles de MMP-9, por densitometría, empleando inmunofluorescencia para ambas determinaciones. En el conteo estereológico de los neutrófilos, no se observaron diferencias significativas en la infiltración entre ambos grupos tras la recanalización tardía de la arteria. Sin embargo, la densitometría obtenida del marcaje de MMP-9 mostró una reducción de la expresión de esta proteasa en animales TLR4^{-/-} 3 horas tras administrar el fibrinolítico, comparado con el grupo de animales TLR4^{+/-}.

En resumen, este primer bloque de resultados constituye la primera evidencia experimental de que el receptor TLR4 está implicado en el fenómeno de TH. El aumento de la expresión de MMP-9 podría ser el mecanismo subyacente a este efecto. Nuestros datos apoyan la inhibición de TLR4 como una prometedora diana terapéutica para prevenir la TH inducida por t-PA, y poder aumentar el número de pacientes que se pueden beneficiar de esta terapia que, como se ha comentado, actualmente es muy limitado.

Por otro lado, **los resultados obtenidos respecto al segundo objetivo** demuestran que TLR4 ejerce un papel en la modulación mieloide en la enfermedad cerebrovascular, principalmente en la población de neutrófilos. En los animales

carentes de TLR4, que presentan un menor volumen de infarto que aquellos que lo expresan, observamos una disminución en el número de neutrófilos en sangre, 2 días tras la isquemia, y un aumento del número de neutrófilos infiltrados en el área infartada. Nuestros resultados también pusieron de manifiesto que este receptor también afecta a la población de células residentes, la microglía, siendo su número más reducido en animales carentes de TLR4, 2 días tras isquemia.

A pesar de que la infiltración de neutrófilos en el cerebro isquémico ha sido reconocida como un importante factor patogénico (del Zoppo, 2010), lo que confirmó nuestro estudio al mostrar que la eliminación de los neutrófilos causa una reducción significativa del volumen del infarto en los animales TLR4^{+/-}, en animales TLR4^{-/-}, la eliminación de los neutrófilos no logró inducir la neuroprotección sugiriendo, por un lado, que, en ausencia de TLR4, los neutrófilos no juegan un papel deletéreo y, por el otro, que el efecto neuroprotector que encontramos en los animales TLR4^{-/-} es, al menos en parte, dependiente de los neutrófilos. En efecto, comprobamos que los neutrófilos de los animales con ausencia de TLR4 tras isquemia presentaban un fenotipo N2 o alternativo, tanto en el parénquima cerebral, como en la sangre. Seguidamente, puesto que se ha descrito que la infiltración del neutrófilo al parénquima cerebral tras la isquemia es dependiente de la interacción con la plaqueta (Sreeramkumar et al., 2014), quisimos comprobar si el proceso de infiltración de neutrófilos y el papel diferencial de los mismos en los animales TLR4^{-/-}, se debía al TLR4 plaquetario, eliminando el receptor en plaquetas (ratón TLR4^{loxP/Pf4-cre}), o al del propio neutrófilo, eliminando el receptor en células mieloides (ratón TLR4^{loxP/Lys-cre}). Así, observamos que, mientras que en los ratones carentes de TLR4 en plaquetas no había reducción del tamaño de la lesión, en los animales carentes de TLR4 en células mieloides se producía una disminución muy marcada. Este resultado correlaciona claramente con un aumento de porcentaje de neutrófilos N2 que también encontramos en el parénquima cerebral.

Por último, realizamos un análisis de expresión génica diferencial en neutrófilos aislados mediante la separación en ambos tipos de ratón (TLR4^{+/-} y TLR4^{-/-}), tras 48 horas de la isquemia. Los resultados obtenidos muestran que los transcriptomas de los neutrófilos TLR4 WT y KO se agrupan en función del genotipo

de cada tipo de muestra (neutrófilos TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-}). Asimismo, comprobamos que los neutrófilos N2 de la sangre de animales que carecen del receptor TLR4, presentan altos niveles de expresión de genes que codifican para proteínas inhibitoras de proteasas y para fosfatasas que intervienen en la regulación de MAP quinasas, cuya ruta juega un papel crucial en la señalización inflamatoria (Kyriakis and Avruch, 2012).

Además, tras isquemia experimental, los neutrófilos con ausencia del receptor TLR4 presentan un mayor marcaje de los receptores de superficie CD32 y Fr11 (CD321). Estos marcadores se encuentran también expresados en neutrófilos humanos, lo que abre nuevas líneas de investigación encaminadas a estudiar las poblaciones de neutrófilos alternativos en sangre de pacientes de ictus y poder relacionarlos directamente con la gravedad de la lesión. El esclarecimiento del factor directamente implicado en la activación de TLR4 a nivel periférico tendría, a su vez, unas enormes consecuencias clínicas, con repercusiones esperanzadoras para el tratamiento de esta enfermedad.

En resumen, nuestros datos apoyan fuertemente la implicación del receptor TLR4 sobre la modulación mieloide en la enfermedad cerebrovascular y demuestran por primera vez la existencia de neutrófilos alternativos N2 o M2-like en la isquemia cerebral experimental dependiente de la ausencia de este receptor. La heterogeneidad de las poblaciones de neutrófilos y la capacidad de la ausencia/inhibición de TLR4 de promover una entrada selectiva de estas células al tejido isquémico es un proceso novedoso para la modulación de la inflamación aguda que abre nuevas esperanzas para el tratamiento de esta patología.

SUMMARY

1. INTRODUCTION

In the Western countries, stroke is the second cause of death (the first cause among women in Spain), the second cause of dementia, and the leading cause of severe disability in adults. Despite these data, the only therapeutic approaches are recanalization of blocked arteries by fibrinolytic treatment through tissue plasminogen activator (t-PA) (only useful in 5-10% of patients), or endovascular thrombectomy (Goyal et al., 2016; Hacke et al., 1995). Therefore, it is necessary the development of new neuroprotective therapies for the treatment in the acute phase of this pathology.

On the one hand, treatment with t-PA is used in very restrictive conditions to avoid the hemorrhagic transformation phenomenon (TH), which is the main complication of thrombolysis. Since HT is also a serious complication after mechanical thrombectomy (Goyal et al., 2016), it is necessary to investigate the mechanisms of HT and the potential therapies that could reduce the risk of it, improving the prognosis of patients with this disease.

In addition, the occurrence of ischemic stroke involves a cascade of inflammatory events (ischemic cascade) that begins in the cerebral microvasculature, where oxidative stress and reactive oxygen species induce the activation of the complement system, platelets and endothelial cells (for review see (Iadecola and Anrather, 2011)). In turn, at the perivascular level and the parenchyma an innate immune response occurs that triggers a strong inflammatory response. One of the major cell types responsible for the brain response is microglia, which triggers the inflammatory response by producing inflammatory mediators, which is done - in part - thanks to intracellular signaling that starts up after activation of toll-like receptors (TLR).

TLRs belong to a family of molecular pattern recognition receptors (PRRs) that are related to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or cell damage (DAMPs). Once the ligand is recognized, TLRs produce inflammatory mediators through intracellular signaling pathways.

Although the physiological functions of TLRs are not well explored, their involvement in processes such as cerebral ischemia and intracerebral hemorrhage has been described (Teng et al., 2009). In the context of hemorrhages, there are indications that relate TLR4 to the HT process since one of the main causes of HT is an increased permeability of the blood-brain barrier (BBB) (Lo, 2008), because of the loss of different components of the basal lamina, and related to a greater expression of MMP-9 that occurs after ischemia (Rosenberg et al., 1998). In addition, it has been shown that MMP-9 is regulated by HMGB1 through the TLR4 receptor (Qiu et al., 2010). In humans, serum levels of MMP-9 predict HT in acute cerebrovascular disease (Castellanos et al., 2003) and HMGB1 correlate with the severity of this disease (Yang et al., 2010).

On the other hand, and with respect to cerebral ischemia, it is known that TLR4 plays an important role in the induction of the inflammatory response and in the production of tissue damage (Caso et al., 2007). In fact, there are several experimental evidences that demonstrate that the deficiency not only of TLR4 but also of TLR2 significantly attenuates the ischemic brain damage (Cao et al., 2007; Caso et al., 2007). It has been reported that TLR4-deficient mice have a lower expression of inflammatory mediators in a context of brain damage (Caso et al., 2007). On the other hand, it has been found that low levels of TLR4 activation prior to ischemia can be beneficial to the central nervous system by protecting it. This process is called ischemic preconditioning and is involved in ischemic tolerance (Pradillo et al., 2009). However, the peripheral involvement of TLR4 in stroke is not well explored. The effect of the TLR4 receptor on circulating bone marrow-derived cells was explored in a study conducted in 2011 with animals deficient for this receptor (Yang et al., 2011). In this work, it was demonstrated that the expression of TLR4 in the peripheral immune cells participates in the ischemic damage in experimental models of stroke. Indeed, these studies demonstrated that, when mice with a wild-type phenotype are removed from these cells by irradiation and subsequently introduced into the bone marrow populations of a mouse lacking the receptor, the volume of infarction decreases. In contrast, if TLR4-deficient mice are

irradiated and the adoptive transfer of marrow cells from mice is performed which, if they exhibit the receptor, the infarct volume increases.

2. HYPOTHESIS AND OBJETIVES

On the one hand, if TLR4 receptor activation is involved in the development of the HT associated with the late administration of t-PA, we have established the following **hypothesis**: And, on the other hand, we wonder what role this receptor plays at the peripheral level and whether it affects the infiltration and phenotype of any of the leukocyte populations after experimental stroke.

To demonstrate this hypothesis, the following **objectives** were proposed:

- Study of the effect of TLR4 receptor on the phenomenon of hemorrhagic transformation.
- Study of the effect of TLR4 receptor on acute infiltration after stroke.

3. METHODS

For all **experimental procedures**, we used C57BL/10ScNJ mice not expressing TLR4 (TLR4^{-/-}) by a natural deletion of the gene; and C57BL/10J expressing the receptor in normal way (TLR4^{+/+}). The age of the animals was young adults (2-3 months). The experimental model for the induction of permanent focal ischemia for the first objective was the in situ thromboembolic model (Orset et al., 2007), with early and late administration of t-PA to recanalize the artery (García-Yébenes et al., 2011); For the second objective the occlusion of the middle cerebral artery was performed by a ligature below the bifurcation of the ACM ((Chen et al., 1986) modified) trunk.

4. RESULTS

The results obtained regarding the **first objective** show that the TLR4 receptor is involved in the damage in an experimental in situ thromboembolic model, since the TLR4^{+/+} animals presented an infarct volume higher than TLR4^{-/-}. In these animals, TLR4 expression was primarily identified in neurons by

immunofluorescence techniques. On the other hand, we observed the relationship of TLR4 to the HT process after late reperfusion of MCA, since an increase in bleeding severity and bleeding area is observed when compared to animals that lack the receptor. To reinforce these results, we decided to study the BBB integrity of these late reperfusion experimental groups by immunofluorescence labeling of immunoglobulin G, and we observed that the TLR4^{+/+} animals showed a higher extravasation of this protein in the damaged area. Finally, we decided to study the state of one of the mediators of HT. Among them, we chose the number of neutrophils infiltrated and MMP-9 levels by densitometry, using immunofluorescence for both determinations. In the stereological neutrophil count, no significant differences were observed in the infiltration between the two groups after the late recanalization of the artery. However, the densitometry obtained from MMP-9 labeling showed a reduction in the expression of this protease in TLR4^{-/-} 3 h animals after fibrinolytic administration, compared to the group of TLR4^{+/+} animals.

In summary, this first block of results constitutes the first experimental evidence that the TLR4 receptor is involved in the TH phenomenon. Increased MMP-9 expression could be the underlying mechanism for this effect. Our data support the inhibition of TLR4 as a promising therapeutic target to prevent t-PA-induced TH, and to increase the number of patients who can benefit from this therapy, which, as discussed, is currently very limited.

On the other hand, the results obtained regarding the **second objective** demonstrate that TLR4 plays a role in myeloid modulation in cerebrovascular disease, mainly in the neutrophil population. In animals lacking TLR4 that have a lower infarct volume in relation to those who express it, we observed that there is a decrease in the number of neutrophils in the blood, 2 days after ischemia, and an increase in the number of neutrophils infiltrated in the area Infarct In this context, this receptor also affects the population of resident cells, the microglia, being the smallest number in animals lacking TLR4, 2 days after ischemia.

Although neutrophil infiltration into the ischemic brain has been recognized as an important pathogenic factor (del Zoppo, 2010), and in fact, our study showed

that neutrophil clearance causes a significant reduction in the volume of the neutrophil. Infarction in TLR4^{+/+} animals. However, in TLR4^{-/-} animals, the elimination of neutrophils failed to induce neuroprotection suggesting, on the one hand, that in the absence of TLR4, neutrophils do not play a deleterious role and, on the other hand, that the neuroprotective effect which we find in TLR4^{-/-} animals is, at least in part, dependent on neutrophils. Thus, we verified that the neutrophils of the animals with absence of TLR4 after ischemia displayed an N2 or alternative phenotype, in both the cerebral parenchyma and in the blood. Subsequently, since neutrophil infiltration to the cerebral parenchyma after ischemia has been reported to be dependent on platelet interaction (Sreeramkumar et al., 2014), we wanted to check whether the neutrophil infiltration process and the differential role of (TLR4^{loxP/Pf4-cre} mouse), or to the neutrophil itself, by deleting the receptor in myeloid cells (TLR4^{loxP/Lys-cre} mouse). We observed that while in TLR4-deficient mice on platelets there was no reduction in lesion size, a marked decrease occurred in TLR4-deficient animals in myeloid cells. This result clearly correlates with an increased percentage of N2 neutrophils that we also find in the cerebral parenchyma.

Finally, we performed a differential gene expression analysis on neutrophils isolated by separation in both mouse types (TLR4^{+/+} and TLR4^{-/-}), after 48 hours of ischemia. The results show that the TLR4 WT and KO neutrophil transcripts are grouped according to the genotype of each sample type (neutrophils TLR4^{+/+} and TLR4^{-/-}). We could also verify that the N2 neutrophils in the blood of animals lacking the TLR4 receptor have high levels of gene expression coding for protease inhibitory proteins and phosphatase genes involved in the regulation of MAP kinases whose pathway plays A crucial role in inflammatory signaling (Kyriakis and Avruch, 2012).

In addition, after experimental ischemia, neutrophils with absence of the TLR4 receptor show more labeling of surface receptors CD32 and Fr11 (CD321). These markers are also expressed in human neutrophils, whose opens a possibility to study the populations of alternative neutrophils in the blood of stroke patients and to be able to relate them directly to the severity of the lesion. If we also find out

what factor is directly involved in the activation of TLR4 at the peripheral level, it would have enormous clinical consequences that are hopeful for the treatment of this disease.

In summary, our data strongly support the involvement of the TLR4 receptor on myeloid modulation in cerebrovascular disease and demonstrate for the first time the existence of N2 or M2-like alternative neutrophils in experimental cerebral ischemia, dependent on the absence of this receptor. The heterogeneity of neutrophil populations and the ability of the absence of TLR4 to promote a selective entry of these cells into ischemic tissue is a novel process for the modulation of acute inflammation that opens new hopes for the treatment of this pathology.

INTRODUCCIÓN

1. LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

1.1. DEFINICIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define **ictus** o **enfermedad cerebrovascular isquémica aguda** como “la aparición súbita de trastornos de la función cerebral, con síntomas que duran más de 24 horas, o que llevan a la muerte, sin otra causa aparente que un origen vascular” (1988).

El ictus ocurre cuando se produce la disminución brusca del aporte sanguíneo a un área concreta del cerebro, bien por la presencia de un coágulo o trombo (ictus isquémico), o bien por la ruptura de un vaso sanguíneo y la consecuente extravasación sanguínea (ictus hemorrágico). Evidentemente, los síntomas que se manifiestan variarán según el área irrigada por el vaso afectado, pudiendo revertirse total o parcialmente si se recupera el flujo de forma temprana. En caso contrario, el cese del aporte sanguíneo desencadena una serie de eventos bioquímicos, conocidos como la **cascada isquémica**, que llevan a la muerte celular y a la aparición de una zona infartada, que de ser extensa o afectar a áreas clave del cerebro puede comprometer la vida del paciente.

1.2. CLASIFICACIÓN

La mayoría de los autores clasifican el ictus en isquémico o hemorrágico (Caplan, 2011) y, a su vez, los sub-clasifican según su etiología (Figura 1):

A) ICTUS HEMORRÁGICO: Supone aproximadamente un 12% de los casos y tiene lugar por la ruptura de un vaso y liberación de sangre en el tejido circundante.

Se subclasifica en:

-Hemorragia subaracnoidea: se produce en el compartimento subaracnoideo. Representa un 5,4% de los casos.

-Hemorragia intracerebral: se produce por la ruptura de un vaso sanguíneo que libera sangre dentro del parénquima cerebral o ventrículos cerebrales. Representa un 8,6% de los casos.

B) ICTUS ISQUÉMICO: Supone un 86% de los casos y se produce como consecuencia de la obstrucción de un vaso por embolia o trombosis, produciendo una reducción completa o intensa del flujo sanguíneo en esa zona.

Dentro del ictus isquémico podemos encontrar 3 subtipos: **de origen extravascular** al producirse por una compresión vascular debida a otros fenómenos como traumatismos o quistes (isquemia focal), **de origen vascular** al producirse por vasoespasmo, vasculitis o estenosis (isquemia focal), y **de origen intravascular** resultando ser el más habitual y estudiado, ya que se produce por la presencia de un coágulo o un émbolo dentro de un vaso (isquemia focal).

Dentro del subtipo de origen intravascular existen varias sub-clasificaciones basadas en la etiología, aunque muy semejantes entre ellas (Chen et al., 2012). Lo que varía entre una y otra es la evolución de las técnicas usadas para el diagnóstico, lo que ha llevado a modificar levemente los criterios de clasificación, siendo la más conocida la clasificación TOAST (trial of ORG 10172 in acute stroke treatment). Distingue ictus **aterotrombótico** (10-35%), **cardioembólico** (25-35%), **lacunar** (20-30%), de **causa inhabitual** (2-5%) y de **causa desconocida** (15-35%) (Bejot et al., 2008; Ihle-Hansen et al., 2012; Kolominsky-Rabas et al., 2001).

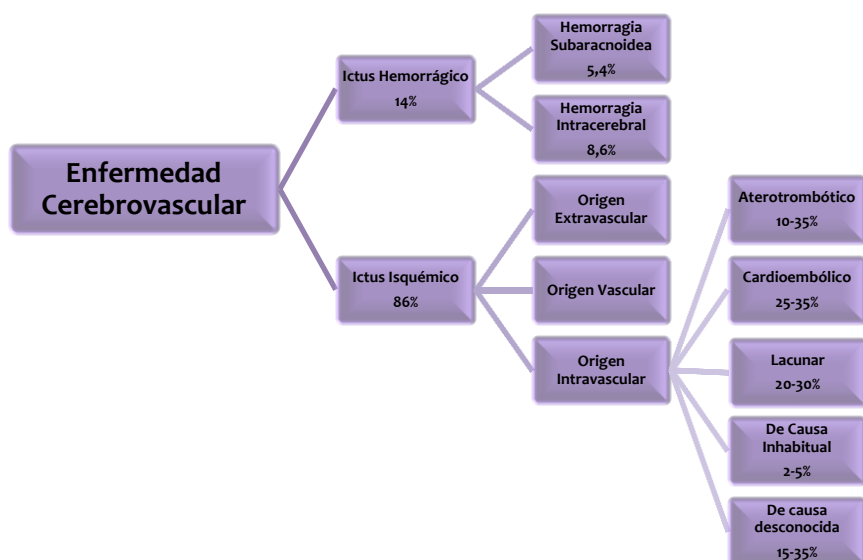


Figura 1. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular según el tipo (isquémica o hemorrágica) y subclasificación según el origen de la oclusión, el tipo de isquemia o su etiología.

Algunos autores clasifican el **ataque isquémico transitorio (AIT)** dentro del grupo de ictus isquémico por ser una patología cerebrovascular de naturaleza isquémica. Sin embargo, este fenómeno se caracteriza porque los síntomas neurológicos desaparecen antes de las 24 h de evolución, y no se produce muerte alguna del tejido cerebral. Por ello, según la definición de la OMS, el término ictus no englobaría a los AIT.

1.3. EPIDEMIOLOGÍA

1.3.1. El ictus en la sociedad

Las enfermedades cerebrovasculares se posicionan como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, con un importante impacto social y económico para los sistemas sanitarios (OMS). Si hablamos del ictus propiamente dicho, éste es la segunda causa de muerte en el mundo, representando un 11% de los fallecimientos y siendo sólo superado por la isquemia cardiaca con un 13% (Lozano et al., 2012). En los países más desarrollados, en donde la esperanza de vida es alta, la incidencia del ictus ha disminuido ligeramente, en parte, gracias al control de los factores de riesgo (Carandang et al., 2006). Además, un buen acceso a la sanidad, junto con un mejor tratamiento de la enfermedad y conocimiento por parte de la población, hace que disminuya la mortalidad (Carandang et al., 2006; Norrving and Kissela, 2013). Así, en Norteamérica, Europa Occidental y del Norte, Japón y Australia la mortalidad por ictus es claramente menor que en Europa del Este, Sudamérica y el sudeste asiático. Según datos del Instituto Nacional de Estadística (2012), en nuestro país, la enfermedad cerebrovascular (ECV) es la primera causa de muerte en mujeres, ocupando el segundo lugar como causa de mortalidad en la sociedad española y consumiendo un 3-4% del gasto total sanitario. No debemos de olvidar que la carga provocada por las enfermedades cerebrovasculares está aumentando rápidamente debido al envejecimiento de la población española. Sin embargo, el verdadero impacto del ictus no debe valorarse sólo en términos de incidencia o mortalidad. De hecho, esta enfermedad suele ser más discapacitante que letal, llegándose a estimar que aproximadamente un 70% de los pacientes sobrevive a un ictus. En EE.UU., la mortalidad en el primer año tras un ictus

isquémico es tan solo del 10% mientras que, en el caso de los hemorrágicos, es algo mayor del 45% (Rosamond et al., 2008).

1.3.2. Factores de riesgo

El ictus presenta varios factores de riesgo, ya que es una enfermedad compleja y heterogénea que atiende a muy diversas causas. Concretamente, la prevención ha demostrado ser la mejor estrategia para luchar contra esta enfermedad y paliar sus enormes consecuencias sociales, sanitarias y económicas. Diferentes estudios epidemiológicos tratan de identificar estos factores y de ver su evolución en la sociedad, siendo uno de los más importantes el estudio INTERSTROKE (O'Donnell et al., 2010). Los factores de riesgo se clasifican principalmente en:

A) NO MODIFICABLES: Son aquellos que no pueden ser controlados ni alterados. Su importancia se ve incrementada en las sociedades más desarrolladas, puesto que la prevención disminuye el impacto de los modificables. Estos son la edad, el sexo y la raza.

B) MODIFICABLES: Son aquellos sobre los que se puede actuar y controlar con un tratamiento médico adecuado. Los principales son: hipertensión, fibrilación auricular, diabetes mellitus, factores psicosociales (tanto el estrés como la depresión han mostrado aumentar aproximadamente un 30% las posibilidades de sufrir un ictus), y por último la obesidad, dieta, tabaco, alcohol e inactividad física, que tienen que ver con el estilo de vida del paciente.

2. FISIOPATOLOGÍA DEL ICTUS ISQUÉMICO

2.1. ISQUEMIA CEREBRAL: DEFINICION DE CORE Y PENUMBRA

Tras un ictus isquémico, el tejido afectado va a sufrir diferentes grados de reducción del flujo sanguíneo (Astrup et al., 1981; Pulsinelli, 1992) dependiendo, básicamente, de la irrigación por vasos colaterales. Este fenómeno lleva asociado una drástica reducción en los niveles de oxígeno y glucosa que inevitablemente

conduce a un fallo bioenergético y a una supresión metabólica (Hossmann, 2009). Podemos definir **core o núcleo isquémico** como el territorio en donde se produce un mayor grado de isquemia al encontrarse irrigado exclusivamente por el vaso obstruido (disminución > 10% del flujo basal). En esta área, las células morirán por necrosis de manera inmediata (5-10 min tras la interrupción del flujo sanguíneo). Rodeando esta zona de infarto existe otra, denominada **penumbra isquémica**, en donde el flujo sanguíneo se ve reducido parcialmente al quedar irrigada por vasos colaterales. La perfusión remanente, entre un 10-30% del basal, es suficiente para mantener la viabilidad celular por un tiempo determinado, que dependerá del grado de hipoperfusión, pero no para permitir su función normal (Astrup et al., 1981). De acuerdo con la dinámica temporal de expansión del infarto descrita por Saver y colaboradores en 2010, el mayor potencial terapéutico lo encontramos dentro de la primera hora tras la isquemia, en donde el volumen de la penumbra ocupa aproximadamente el 50% del territorio isquémico. A partir de ahí, el volumen del tejido salvable disminuye considerablemente y, a partir de las 3 horas, la capacidad de recuperación es marginal sufriendo también la penumbra isquémica muerte celular pero, en este caso, por apoptosis (Hossmann, 2012; Saver et al., 2010). Por ello, esta área de penumbra es susceptible de recuperación si se restaura el flujo sanguíneo y se corrigen las alteraciones bioquímicas producidas por la propia isquemia. Finalmente, queda una zona oligohémica rodeando la penumbra, que tiene un flujo sanguíneo menor (entre un 30-50% del basal), pero que cuya viabilidad no está comprometida y hasta donde la muerte celular no progresará, salvo en circunstancias especialmente adversas (para revisión ver (Baron, 2001; Ginsberg and Pulsinelli, 1994; Hossmann, 1994)).

Sin embargo, la distinción entre core y penumbra no está totalmente consensuada. Muchos ictus ocurren por estenosis parcial, por lo que la reducción del flujo sanguíneo puede no ser total y, por lo tanto, carecerían de core según la definición anterior. Además, la isquemia afecta a todos los tipos celulares de la unidad neurovascular y, debido a que no son igual de susceptibles, tanto apoptosis como necrosis, e incluso formas intermedias de muerte, ocurren de manera simultánea en el tejido isquémico. Por ello, a efectos prácticos, se considera core

como aquel territorio insalvable en donde ya se está produciendo la muerte celular, y penumbra, el área susceptible de ser salvada (Fisher and Albers, 2013).

Si bien cabría pensar que la penumbra no evolucionará a core si se restaura el flujo sanguíneo cerebral, se ha comprobado que, cuando el proceso de muerte celular ha alcanzado un determinado punto, la reperfusión no solo no frena la progresión, sino que puede potenciar los mediadores de la cascada isquémica, facilitando la progresión de la zona de penumbra hacia la muerte celular. A este fenómeno se le denomina **daño por reperfusión**. Los mecanismos que están implicados en este daño se producen cuando se restaura la circulación cerebral y existe un exceso de disponibilidad de oxígeno, que va a reaccionar formando sobre todo especies reactivas de oxígeno (EROs) y nitrógeno (ERNs). Es importante aclarar que, si bien estos procesos aceleran el daño celular al producirse la reoxigenación, no contribuyen a extender la lesión a zonas no isquémicas, afectando sólo al tejido comprometido que, de no producirse la reperfusión, moriría por otros mecanismos (para revisión ver (Sanderson et al., 2013)).

2.2. LA CASCADA ISQUEMICA

Tras un ictus isquémico, ya sea transitorio o permanente, se produce una serie de eventos bioquímicos y moleculares heterogéneos que transcurren en un tiempo y espacio determinado, pudiendo prolongarse a semanas o meses. A este conjunto de procesos se los conoce comúnmente como **la cascada isquémica**. De manera temporal, la cascada isquémica puede resumirse como un fallo bioenergético que se continúa con un proceso de excitotoxicidad, estrés oxidativo, disfunción de la barrera hematoencefálica, daño microvascular, inflamación y, finalmente, daño celular irreversible (Figura 2 y 3) (Revisado en (Brouns and De Deyn, 2009; Durukan and Tatlisumak, 2007)).

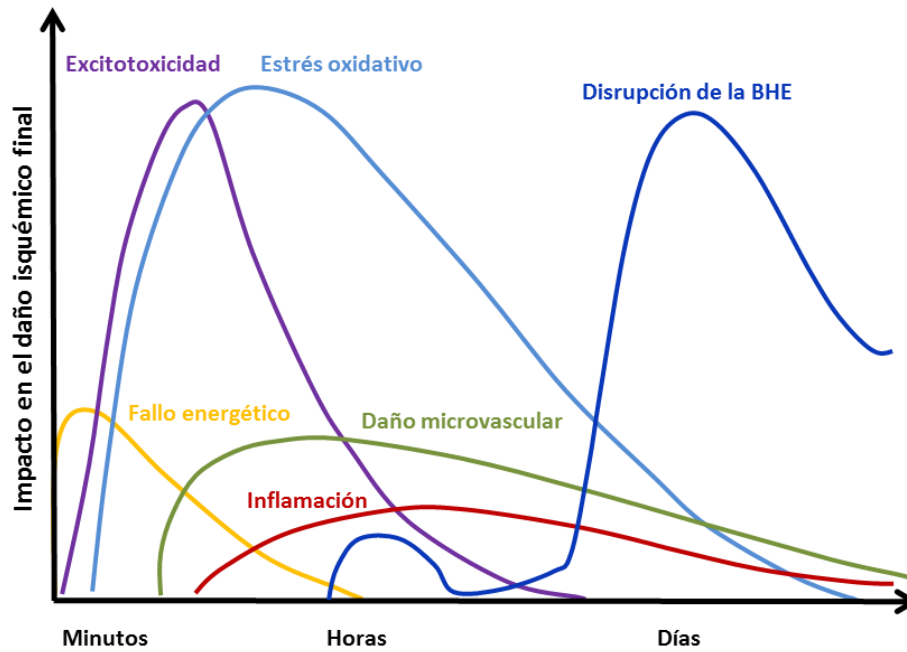


Figura 2. Secuencia temporal de eventos que participan en el daño isquémico (adaptado de (Brouns and De Deyn, 2009)).



Figura 3. La cascada isquémica. Principales eventos moleculares y celulares desencadenados por la isquemia y que llevan a la muerte celular. AAE (Aminoácidos excitatorios) (Modificado de (Yenari and Han, 2012)).

Las principales consecuencias de la isquemia cerebral se generan fundamentalmente por un **fallo energético**. En un área de aporte de sangre reducido, el consumo de adenosín trifosfato (ATP) continúa a pesar de que la síntesis sea insuficiente, provocando que los niveles totales de ATP caigan y se desarrolle acidosis láctica, con pérdida concomitante de la homeostasis iónica (a través de la afectación de las bombas dependientes de ATP como la Na^+/K^+ ATPasa), en las neuronas y células gliales de la zona hipoperfundida. Como consecuencia, los canales dependientes de Ca^{2+} se activan, ocasionando una entrada masiva de Ca^{2+} al citoplasma neuronal. Este hecho incrementa aún más la despolarización de la membrana y produce una liberación masiva de glutamato y otros neurotransmisores de tipo excitatorio al espacio extracelular (Katsura et al., 1994; Martin et al., 1994). Estas neuronas se despolarizan provocando mayor flujo de Ca^{2+} y más liberación de glutamato. Por otro lado, los receptores de glutamato promueven un exceso de flujo de Na^+ y de agua que provoca que se hinchen las células, se produzca edema y, en consecuencia, se reduzca el espacio extracelular. La liberación del glutamato produce disfunción mitocondrial y producción de EROs y ERNs que, en última instancia, darán lugar a la liberación de citocromo C, activación de caspasas y, finalmente, muerte por apoptosis. Por otro lado, el exceso de glutamato liberado al espacio extracelular provocará **excitotoxicidad** en el área afectada y actuará principalmente sobre los receptores ionotrópicos glutamatérgicos de tipo AMPA (2-amino-3-(hidroxi-5-metil-5-metili soxazol-4-il) propionato) y NMDA (N-metil-D-aspartato) (Chen et al., 2008; Choi, 1988a; Choi, 1988b; Dirnagl et al., 1999). La sobreactivación de este tipo de receptores glutamatérgicos contribuye a una mayor despolarización de las membranas, incrementando aún más la entrada de Ca^{2+} al espacio intracelular, así como a una mayor liberación de glutamato al espacio extracelular. Estos procesos se traducen por tanto en una amplificación local del daño isquémico inicial. El aumento de Ca^{2+} es un factor clave en los procesos que conducen al daño neuronal irreversible ya que, de manera directa o indirecta, participa en la muerte neuronal mediante procesos de necrosis y/o apoptosis (Fisher and Schaebitz, 2000; Martin et al., 1998). Además de las consecuencias provocadas por la falta de oxígeno y glucosa, tras el ictus se producen señales de estrés que activarán rutas de supervivencia como la de

AKT, donde se producen factores tróficos que permitirán la neurogénesis, angiogénesis y sinaptogénesis, aunque esas mismas señales de estrés también participan en la producción de EROs y ERNs en exceso, que provocan **estrés oxidativo** y del cual las defensas antioxidantes endógenas son insuficientes para contrarrestarlas (Kontos, 1985; Love, 1999; Siesjö et al., 1989). Por último, estas señales de estrés producen mayor liberación de citoquinas proinflamatorias que activarán proteasas como las metaloproteinasas de matriz (MMPs), que dañarán el endotelio con la formación del edema vasogénico llegando a comprometer la **integridad de la barrera hematoencefálica (BHE)**. Esta estructura es fundamental para la regulación de la homeostasis cerebral y para el mantenimiento del privilegio inmunológico. A nivel estructural y funcional, la BHE está formada por células endoteliales conectadas a través de las denominadas “uniones estrechas”, dotándola de una baja permeabilidad o una permeabilidad selectiva para el paso de sustancias al cerebro. Los astrocitos, los pericitos, las neuronas y la matriz extracelular que rodea a los vasos también contribuyen al correcto funcionamiento de la barrera, formando la denominada **unidad neurovascular** (ver Figura 7 más adelante) (Iadecola and Anrather, 2011).

2.3. INFLAMACIÓN

A medida que la isquemia progresa, se produce en paralelo una robusta respuesta inflamatoria que tiene, como principales implicados, moléculas de señalización, células inmunes y moléculas de adhesión. El proceso inflamatorio se prolonga durante días y, si bien puede agravar el daño cerebral de forma aguda, también se sabe que su inhibición es contraproducente a períodos de tiempo más largos ya que inicia los procesos de resolución del daño y remodelado.

Esta respuesta inflamatoria se caracteriza por el establecimiento de una secuencia de eventos que implican al cerebro, su vasculatura, la sangre circulante y los órganos linfoides.

Por un lado, se produce una **inflamación vascular y perivascular** (Figura 4) debido a que, en la microvasculatura cerebral, el estrés oxidativo y las EROs/ERNs inducen la activación del sistema del complemento, las plaquetas y las células

endoteliales (Iadecola and Anrather, 2011). El endotelio activado perderá la permeabilidad selectiva de barrera produciéndose la extravasación de constituyentes del plasma al cerebro. Además, se inducirá la sobreexpresión de selectinas endoteliales que favorecerán la unión de leucocitos a los vasos. Todo esto, sumado a un incremento en la secreción de proteasas de origen leucocitario, junto con la regulación a la baja de la expresión de las proteínas endoteliales de unión estrecha que sellan la unidad neurovascular, favorecerá la extravasación paracelular de proteínas y leucocitos circulantes al parénquima cerebral (del Zoppo, 2006).

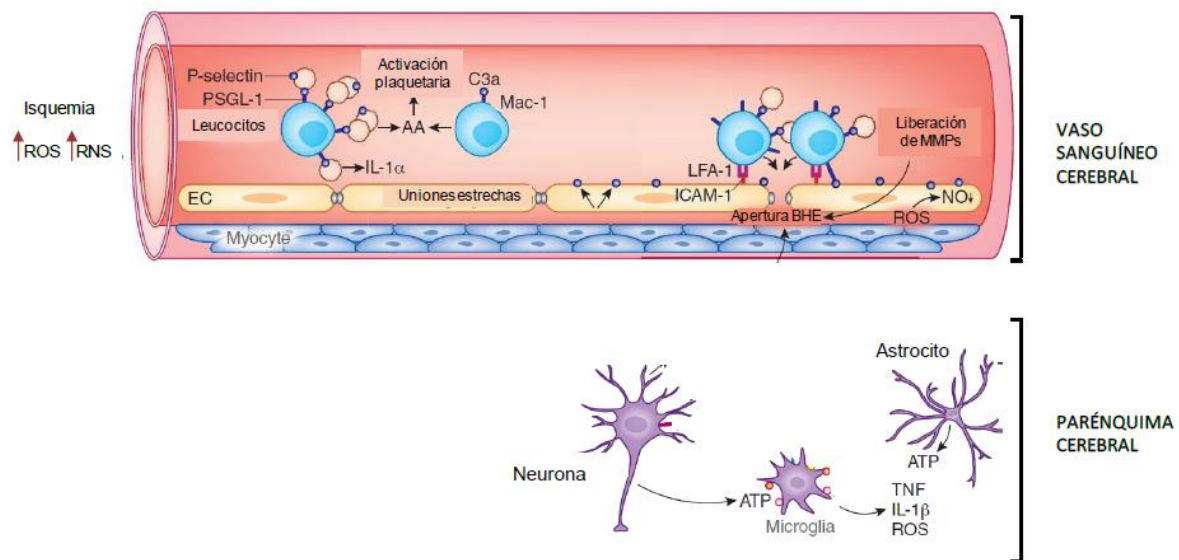


Figura 4. Inflamación vascular y perivascular. En el lumen de los vasos sanguíneos, los distintos mecanismos que acontecen dan lugar a la apertura de la BHE, que permite la extravasación de células y otros componentes del plasma al parénquima cerebral, lo que activará las células residentes provocando el proceso inflamatorio (modificado de (Iadecola and Anrather, 2011)).

Por otro lado, mientras la cascada isquémica progresa, la muerte celular, asociada principalmente a la necrosis tisular que induce la isquemia, lleva a una nueva fase de la respuesta inflamatoria, esta vez **inflamación tisular** (Figura 5). Las células muertas liberan “señales de peligro” que activan el sistema inmune. Esta activación se lleva a cabo mediante un conjunto de receptores capaces de detectar moléculas que alertan sobre el peligro al organismo y que se denominan DAMPs

(“damage associated molecular patterns”), que activan a los receptores *toll-like* (TLRs), especialmente TLR2 y TLR4 sobre la membrana de la microglía. La activación de estos receptores induce la expresión de moléculas pro-inflamatorias en sus células diana (Takeda and Akira, 2005). Todo este proceso de activación inmunológica, asociado a la defensa del huésped y a la eliminación de restos celulares, puede considerarse como una parte integral de la inmunidad innata.

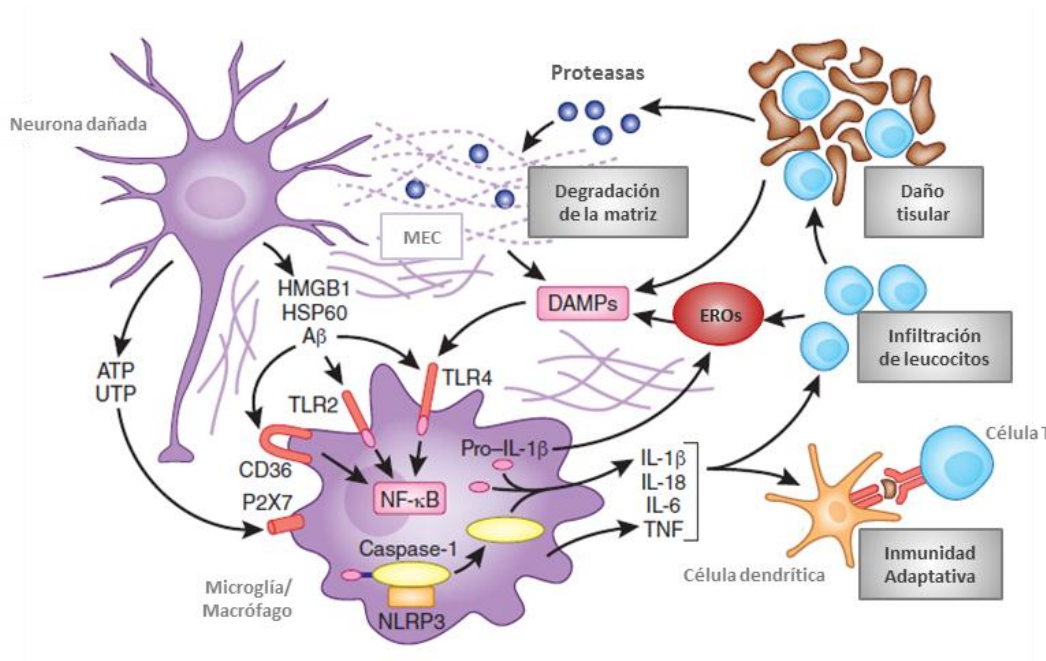


Figura 5. Mecanismos de inflamación tisular y activación de la inmunidad. La muerte celular conduce a la activación de DAMPs, los cuales activan a los receptores *toll-like* (TLRs) que llevan a la activación de la expresión de genes pro-inflamatorios a través del factor nuclear- κ B (NF- κ B). Estas citoquinas, a su vez, activan a células presentadoras de antígenos que establecen las bases de la inmunidad adaptativa. Modificado de (Iadecola and Anrather, 2011).

Debido a la importancia que representa la inflamación tras ictus isquémico para la presente Tesis Doctoral, más adelante se desarrollará en detalle el proceso de inflamación, los procesos de activación de las células residentes y el papel de las células reclutadas de la periferia a la zona donde se produce el daño.

2.4. RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN Y REPARACIÓN DEL TEJIDO

La inflamación post-isquémica es un proceso autolimitado ya que finalmente disminuye y prepara el terreno para la reorganización estructural y funcional del cerebro lesionado. Los factores que gobiernan la resolución de la inflamación y el restablecimiento de la homeostasis de los tejidos, y en particular en el cerebro, son aún poco conocidos. Las evidencias sugieren que la resolución de la inflamación no es un proceso pasivo debido al agotamiento de la señalización, sino que está orquestada por la interacción de un gran número de mediadores que suprimen activamente la respuesta inflamatoria (Spite and Serhan, 2010). Los principales mecanismos que se dan en el proceso incluyen la eliminación de células muertas, el desarrollo de un medio antiinflamatorio y la generación de factores pro-supervivencia que fomentan la reconstrucción y reparación de tejidos (Figura 6) (Nathan and Ding, 2010; Shichita et al., 2014; Spite and Serhan, 2010). La fagocitosis promueve la secreción de IL-10 y TGF- β que, a su vez, suprimen la presentación de antígenos, promueven la formación de linfocitos T reguladores (Treg), inhiben la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y la producción de citoquinas proinflamatorias. Además, IL-10 y TGF- β son también neuroprotectores y facilitarán los procesos de reparación cerebral. Por otro lado, las lipoxinas, resolvinas y protectinas juegan un papel muy activo en la resolución de la inflamación (Ballesteros et al., 2014b; Moraga et al., 2014). Los factores de crecimiento (VEGF, BDNF, FGF...) y las MMPs que producen las células endoteliales, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía son moléculas fundamentales también para reorganizar el tejido y repararlo (Iadecola and Anrather, 2011).

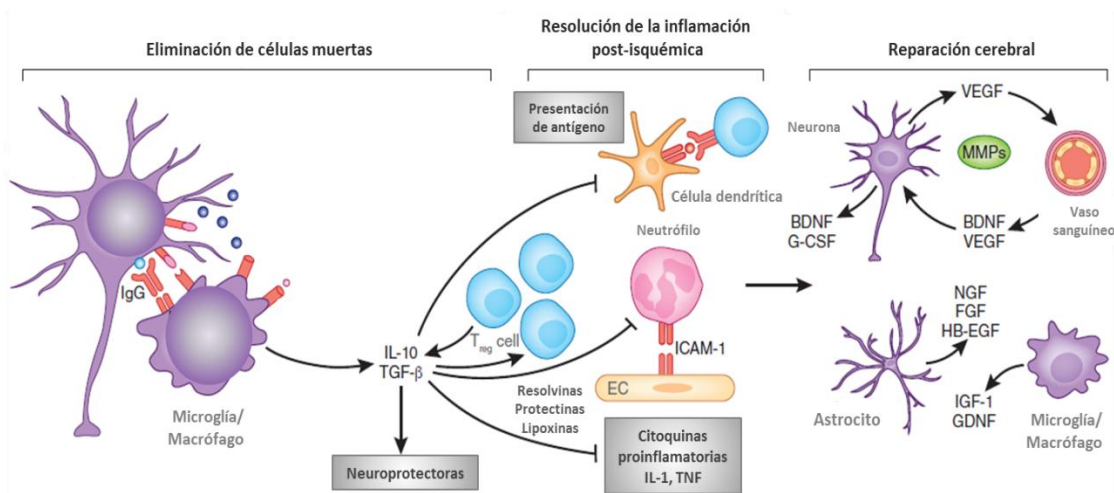


Figura 6. Resolución de la inflamación y reparación del tejido. Al eliminarse los restos de células muertas por las células fagocíticas, la inflamación empieza a resolverse junto con la producción de citoquinas anti-inflamatorias y moléculas como las lipoxinas. Los factores de crecimiento y las MMPs producidas por las células endoteliales, las neuronas, los astrocitos o la microglía son moléculas clave que impulsan la reorganización y reparación de tejidos. Modificado de (Iadecola and Anrather, 2011).

3. TRATAMIENTO DEL ICTUS ISQUÉMICO

Pese a sus devastadores efectos a nivel mundial, el ictus isquémico continúa siendo uno de los mayores retos para la medicina actual. A pesar de que la inversión para la investigación en este campo ha sido enorme, son muy pocos los avances en cuanto al tratamiento, a excepción de la terapia trombolítica con t-PA (activador tisular del plasminógeno, “tisular plasminogen activator”) que, hasta la fecha, es el único fármaco aprobado para la fase aguda del ictus isquémico. Más recientemente, principalmente la prevención mediante el control de los factores de riesgo y la atención especializada en las **unidades de ictus** (Ringelstein et al., 2013) han ayudado a disminuir la repercusión de esta enfermedad en las sociedades occidentales (Meretoja et al., 2011; Terént et al., 2009). Estas unidades especializadas en el manejo del ictus presentan protocolos unificados de tratamiento y un riguroso control de las medidas generales. En España, estas unidades se han creado acompañadas del llamado **código ictus** que se refiere a la actuación coordinada de los servicios de urgencias extrahospitalarios con las

unidades de ictus de los centros hospitalarios para atender al paciente de forma rápida y adecuada, monitorizándolo y llevándolo hasta una unidad de ictus a la que podrá llegar con un diagnóstico y control precisos.

3.1. EL FRACASO DE LA “NEUROPROTECCIÓN” EN FASE AGUDA DEL ICTUS

Como consecuencia de los escasos recursos para el tratamiento en fase aguda del ictus surge el concepto de la neuroprotección. Los agentes neuroprotectores tratan de limitar el daño isquémico al prevenir la muerte de las neuronas que rodean al núcleo del infarto, disminuyendo por tanto la lesión isquémica. En el proceso isquémico existen gran cantidad de posibles dianas mediadoras de daño que pueden ser modificadas farmacológicamente para inducir neuroprotección (Fisher and Roundtable, 2003; Fisher et al., 2009). Se han desarrollado un gran número de estudios en investigación básica usando modelos experimentales de isquemia cerebral, que muestran la efectividad de diferentes agentes neuroprotectores (O'Collins et al., 2006). Estos estudios abren nuevas posibilidades para el tratamiento del ictus isquémico en fase aguda. Sin embargo, estas terapias han fallado de forma contundente en su traslación a la clínica al ser incapaces de reproducir los efectos beneficiosos mostrados en animales (Kidwell et al., 2001). Hasta la fecha, los ensayos clínicos realizados con diferentes agentes potencialmente neuroprotectores ([http://www.strokecenter.org /trials/](http://www.strokecenter.org/trials/)), que habían mostrado resultados positivos en modelos experimentales (O'Collins et al., 2006), no han mostrado beneficio a nivel clínico en fase aguda del ictus isquémico (Minnerup et al., 2012). Algunas de los aspectos que han sido analizados, por diferentes autores (Cheng et al., 2004; Gladstone et al., 2002; Sutherland et al., 2012; Turner et al., 2013; Young et al., 2007) para averiguar el fracaso de los agentes neuroprotectores son, principalmente, el diseño inapropiado del ensayo clínico y la elección de agentes cuyas evidencias neuroprotectoras a nivel pre-clínico son insuficientes (Tabla 1) (Sutherland et al., 2012; Turner et al., 2013).

Modelos animales (Ensayos pre-clínicos)	Estudios humanos (Ensayos clínicos)
Población homogénea altamente controlada	Población variable y heterogénea (sexo, edad...)
Animales jóvenes	Pacientes envejecidos
Infarto cerebral inducido	Infarto cerebral espontáneo
Etiología uniforme	Etiología variable
Comorbilidad limitada	Numerosas comorbilidades
Territorio de la ACM afectado	Territorio isquémico afectado variable
Administración temprana del fármaco	Administración tardía del fármaco
Control de la duración de la oclusión	Tiempo de oclusión variable
Múltiples vías de administración	Rutas limitadas de administración
Pronóstico estimado mediante volumen de infarto	Pronóstico estimado mediante funcionalidad

Tabla 1. Fallo en la traslacionalidad de los agentes neuroprotectores en fase aguda del ictus isquémico de los estudios pre-clínicos en modelos animales a los ensayos clínicos en humanos (Modificado de Sutherland et al., 2012).

Con el fin de mejorar una posible traslacionalidad de los estudios pre-clínicos y el diseño de los ensayos clínicos con agentes neuroprotectores, se establecieron las recomendaciones **STAIR** (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable) (Albers et al., 2011). Aunque hasta la fecha el futuro de la terapia farmacológica de esta enfermedad es todavía incierto (Chamorro et al., 2016), la búsqueda de dianas terapéuticas de interés clínico en la fase aguda del ictus, siguiendo las recomendaciones STAIR, permitirá abrir posibilidades para la aplicación de tratamientos que puedan disminuir el daño provocado por esta enfermedad. Por otro lado, las nuevas tendencias se centran en la mejora de la terapia trombolítica, con resultados bastante esperanzadores en estudios experimentales y clínicos. El objetivo es aumentar el número de pacientes que puede beneficiarse de ella, ampliando su ventana terapéutica y paliando sus importantes efectos secundarios mediante terapias de reperusión alternativas o co-tratamientos (Zhang et al., 2012).

3.2. TERAPIA TROMBOLÍTICA

Tras años de intensas investigaciones centradas en la búsqueda de fármacos para el tratamiento de esta patología, en 1995 el NINDS (1995) publica por primera vez un tratamiento farmacológico agudo beneficioso para pacientes de ictus isquémico. Este tratamiento consiste en la recanalización de la arteria ocluida

mediante la administración intravenosa (IV) del **r-tPA** (activador tisular del plasminógeno recombinante, alteplasa) que era capaz de disminuir los déficits a los 3 meses si se administraba dentro de las 3 primeras horas tras el inicio de los síntomas. Solo un año más tarde (1996) la administración IV del r-tPA se aprobó por la FDA (Food and Drug Administration) estadounidense como tratamiento en fase aguda para pacientes con ictus isquémico, con la subsiguiente aprobación del resto de agencias a nivel mundial, ya que estudios clínicos, como el ATLANTIS (Alteplase thrombolysis for acute non interventional therapy in ischemic stroke) (Albers et al., 2002) y el ECASS (European cooperative acute stroke study (Steiner et al., 1998)), confirmaron este efecto beneficioso dentro de las 3 primeras horas, lo que llevó también a la agencia europea, la EMA (European Medicines Agency), a aprobar más tarde (2002) el uso del t-PA.

En la actualidad, la reperusión de la arteria ocluida mediante la administración intravenosa de r-tPA es el único tratamiento aprobado para el manejo en fase aguda del ictus isquémico (revisado en (Cohen et al., 2011)). Sin embargo, los estudios clínicos mencionados en el párrafo anterior (Clark et al., 1999; Hacke et al., 1995; Hacke et al., 1998) describieron que el uso tardío del fármaco aumentaba el riesgo de hemorragias intracerebrales (Fiorelli et al., 1999; Larrue et al., 1997; Larrue et al., 2001), las cuales se asocian a mal pronóstico. Así, para tratar de frenar la principal contraindicación del t-PA, **la transformación hemorrágica (TH)**, el fármaco sólo se administra en condiciones muy restrictivas, quedando excluidos pacientes mayores de 80 años, diabéticos o con hiperglucemia, tratados con anticoagulantes, hipertensos, con historia previa de ictus, con lesiones extensas o con efecto de masa antes del tratamiento, además de aquellos que sobrepasan la ventana terapéutica de 3 h (McArthur et al., 2011).

Por ello, pese a que esta terapia es la única disponible para el tratamiento del ictus, se estima que menos del 2-5% de los pacientes la recibían a principios del siglo XXI, siendo los motivos principales su corta ventana terapéutica y los criterios de exclusión para controlar la TH. Un meta-análisis de todos estos estudios clínicos, en el año 2004, mostró que la terapia trombolítica resultaba más beneficiosa cuanto antes se administrara y podría incluso tener un efecto positivo aplicada hasta 4,5 h

desde el inicio de los síntomas, ampliando así un poco más la ventana terapéutica de este fármaco (Hacke et al., 2004). Esta observación se confirmó en el año 2008 (Hacke et al., 2008), aunque ni la FDA estadounidense ni la EMA han modificado aún la ventana terapéutica de 3 h. Incluso otro meta-análisis realizado en 2012 (Wardlaw et al., 2012) asegura que algunos pacientes se benefician de este tratamiento hasta 6 h tras ictus. Hoy en día se estima que, en algunos países, aproximadamente un 5% de los pacientes de ictus se benefician de la fibrinólisis. Sin embargo, el factor que más ha favorecido el uso del t-PA para el tratamiento del ictus no ha sido la ampliación de la ventana terapéutica, sino la atención de los pacientes en centros especializados que actualmente administran el fibrinolítico a porcentajes bastante mayores al 10%. En cualquier caso, un 5-10% representa un porcentaje escaso de pacientes que pueden beneficiarse del t-PA. Además, sobre un 50% de estos no reperfundan y se estima que el paciente tratado sólo tiene un 30% más de probabilidad de mejorar respecto al no tratado.

Hoy en día están siendo evaluadas algunas mejoras en la trombolisis que tienen por objeto disminuir sus efectos secundarios, principalmente la TH. Las principales aproximaciones son el uso del t-PA incluso en grupos considerados de exclusión (Frank et al., 2013), terapias combinadas con t-PA que permitan que la ventana terapéutica sea mayor (Albers et al., 2011) o la selección de pacientes más propensos a beneficiarse (Kidwell et al., 2013). Así, la terapia de reperusión tiene grandes desafíos para las próximas décadas, como identificar aquellos pacientes más propensos a desarrollar TH o comprobar si existe alguna oportunidad para la neuroprotección en combinación con la recanalización arterial (para revisión ver (Dávalos, 2005)).

El **t-PA** es una serín-proteasa de unos 70 kDa muy abundante tanto en el plasma como en el SNC. La actividad catalítica de esta proteína reside en el dominio proteasa. Además, presenta dos dominios “kringle” responsables de la interacción del t-PA con la fibrina (Rijken et al., 1982). En el torrente sanguíneo, esta molécula viaja unida a los PAIs (inhibidores del activador del plasminógeno), que inhiben su actividad. El t-PA es, como su propio nombre indica, el responsable de activar y convertir el plasminógeno en plasmina.

Cuando se produce un coágulo, el t-PA se une a la red de fibrina, lo que provoca un aumento de la afinidad por el plasminógeno y este, a su vez, se une también a esta red, facilitando la interacción entre ambas proteínas (Lijnen, 2001; Rijken, 1995). Como consecuencia, los PAI se disocian y se forma plasmina sólo en el entorno del coágulo, que degradará la red de fibrina.

Además, las células endoteliales expresan en su superficie la anexina A2, a la que se denomina receptor de t-PA y plasminógeno (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005), que al unir ambas moléculas hace que confluyan, aumentando la formación de plasmina unas 60 veces y ayudando a mantener la fluidez sanguínea. Gracias a estos dos motivos, el t-PA actúa en sangre como un fibrinolítico.

El t-PA es eliminado del torrente sanguíneo gracias a la acción del LRP-1 (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) presente en las células endoteliales, que permite su internalización y degradación en el lisosoma. Sin embargo, parece que este receptor media acciones que van más allá de la eliminación del t-PA. Se ha comprobado que, en condiciones fisiológicas, la unión del t-PA a LRP-1 desencadena una señal intracelular que incrementa la permeabilidad de la BHE (Yepes et al., 2003) produciendo además vasodilatación mediada por NO (Nassar et al., 2004). Esta respuesta podría ser fundamental para mejorar la perfusión sanguínea, pero, ante procesos que lesionen la BHE, como en el caso del ictus (Yang and Rosenberg, 2011), podría exacerbar el daño (para revisión ver (Yepes and Lawrence, 2004)). La adición de t-PA en estos casos parece inducir una mayor apertura de la BHE, tanto MMP-9-dependiente (Wang et al., 2003) como independiente (Copin et al., 2011), que puede ser lesiva e incluso llevar a la TH.

Pero el t-PA presenta otras funciones, entre ellas, la implicación en el remodelado tisular. Ya que es muy abundante en el SNC, aquí puede unirse además a otras proteínas de la MEC (matriz extracelular), principalmente fibronectina y laminina. Parece que, en condiciones normales, esta unión no tiene ningún efecto, pero, cuando estas proteínas se degradan por procesos de remodelado tisular, algunos de sus fragmentos mantienen la capacidad de unirse al t-PA y lo activan, favoreciendo la formación de plasmina (Moser et al., 1993). Por lo tanto, el t-PA,

liberado por microglía y neuronas, ha sido implicado en procesos neurológicos que requieren de un remodelado tisular previo, como son la migración celular y la plasticidad sináptica asociada a procesos como el aprendizaje, la memoria y la potenciación a largo plazo (LTP (Qian et al., 1993)) (para revisión ver ((Melchor and Strickland, 2005; Strickland, 2001; Yepes and Lawrence, 2004)). Sin embargo, un exceso de la actividad del sistema t-PA/plasmina podría llevar a la destrucción de la MEC y a la muerte celular (Chen and Strickland, 1997).

3.3. TROMBECTOMÍA MECÁNICA

Las técnicas invasivas endovasculares han sido probadas durante los últimos 15 años. La trombectomía mecánica (TM) ha probado su efecto beneficioso en el ictus presentando mejores tasas de reperusión que la trombolisis intravenosa (que ronda el 50%). Ensayos que se han llevado a cabo con una tecnología más antigua (trombólisis intraarterial, cateter Merci, etc), no han mostrado ser superior a la fibrinólisis ni por sí sola (Ciccone et al., 2013), ni en combinación con la terapia estándar (Broderick et al., 2013). Sin embargo, estudios recientes que utilizan una tecnología más actual (“stent retrievers”, etc) junto con terapia trombolítica intravenosa han logrado un efecto muy positivo en la mayoría de los pacientes. Una de las características más importante de estos ensayos es que también pudieron incluirse pacientes con contraindicaciones para la trombólisis. Además, la transformación hemorrágica no fue más frecuente en los pacientes que recibieron t-PA ni posteriormente TM en comparación con los controles a los que únicamente se les administró t-PA (Berkhemer et al., 2015; Campbell et al., 2015; Goyal et al., 2015; Jovin et al., 2015; Saver et al., 2015)

4. TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA

El fenómeno de TH consiste en la aparición de una hemorragia intracerebral, como consecuencia del daño a la BHE tras un ictus isquémico. Este proceso forma parte de la evolución natural del ictus isquémico, y se estima que se produce de forma espontánea hasta en un 50% de los pacientes (Arnould et al., 2004; Hornig et

al., 1986). Sin embargo, muchos de estos casos son asintomáticos y no ocurren en las primeras 24 h, por lo que no son clasificados como tales. Las hemorragias parenquimales o sintomáticas se dan en un porcentaje mucho menor, entre un 2-5% (Khatri et al., 2007), aunque son las más severas y se asocian a un deterioro tisular que compromete la vida del paciente (Fiorelli et al., 1999). Su importancia estriba en que pueden llegar a elevar la mortalidad hasta en un 45% ((1995) (incluso hasta el 83% para otros trombolíticos como la urokinasa (Furlan et al., 1999)). Este tipo de hemorragias extensas contribuirían al deterioro del tejido afectado de tres formas: ejerciendo un daño mecánico al comprimir las estructuras aledañas, por un daño isquémico debido a compresión capilar en el territorio circundante, y por un daño tóxico de los componentes sanguíneos extravasados (para revisión ver (Wang and Lo, 2003)).

Aunque la TH forma parte de la evolución natural del ictus, como se ha explicado con anterioridad en la presente Tesis Doctoral, la recanalización del vaso ocluido y, especialmente, la terapia trombolítica intravenosa aumentan el riesgo de sangrado sintomático (sobre un 8-9% ((Larrue et al., 1997; Larrue et al., 2001)), razón por la cual se limita su uso.

4.1. LA IMPORTANCIA DE LA BHE EN EL PROCESO DE TH

Para entender el fenómeno de TH tras ictus es importante conocer los mecanismos por los cuales se produce, que, a grandes rasgos, no es otra cosa más que por una disrupción de la BHE exacerbada.

La BHE es una barrera de difusión que limita el paso de sustancias del torrente sanguíneo al parénquima cerebral y viceversa (Reese and Karnovsky, 1967). La BHE se encarga de mantener aislado al cerebro en un entorno único y estable que garantiza su correcto funcionamiento (para revisión ver (Abbott et al., 2010)). Además de mantener unas concentraciones iónicas (Hansen, 1985) o de pH (Nischwitz et al., 2008) diferentes de las del plasma y resto de los tejidos, también previene del paso de macromoléculas, como muchos metabolitos endógenos y xenobióticos que podrían resultar tóxicos para el cerebro y alterar la función

nerviosa o proteínas sanguíneas que activan vías apoptóticas en el parénquima nervioso, como la inmunoglobulina G (IgG) y la albúmina (Nadal et al., 1995).

En cuanto a su estructura, la BHE está formada por el endotelio cerebral. Tanto los pericitos, la MEC y los astrocitos contribuyen a su desarrollo y correcto funcionamiento, mientras que las neuronas y la microglía pueden alterarlo. Este conjunto es lo que se ha definido como **unidad neurovascular (UNV)** (Figura 7) (para revisión ver (Sandoval and Witt, 2008)), que está compuesta por:

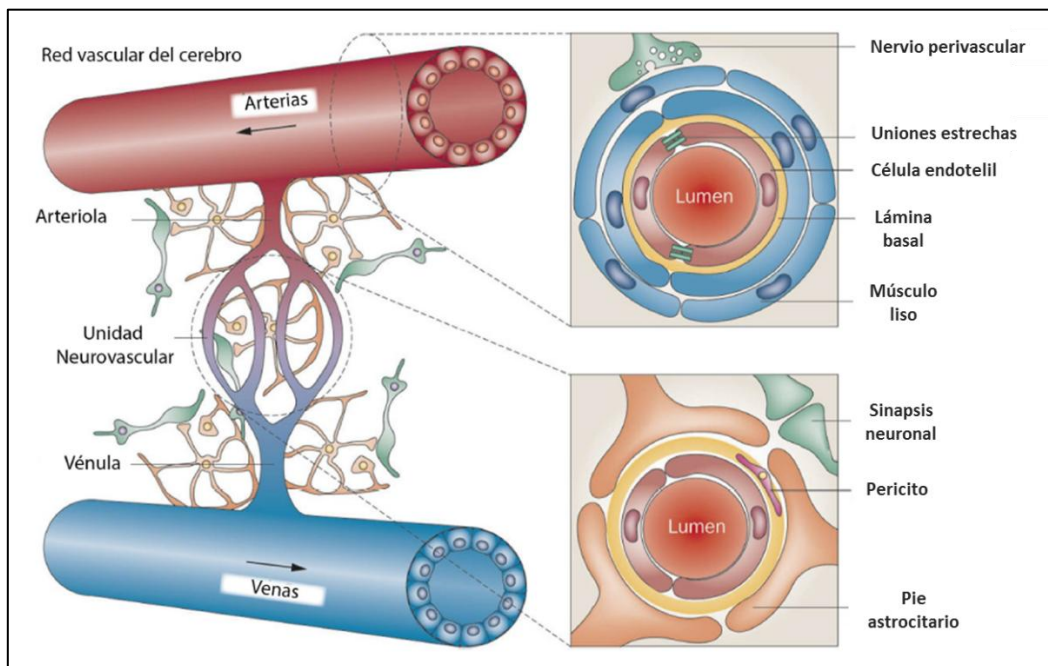


Figura 7. Esquema de la unidad neurovascular. (Esquema adaptado de (Zhang et al., 2012)).

- **Endotelio o células endoteliales (ECs):** no fenestrado, con pocas vesículas de pinocitosis, gran cantidad de mitocondrias (Oldendorf et al., 1977) y, sobre todo, con unas uniones intercelulares únicas: las uniones estrechas y uniones adherentes. Estas uniones sellan el espacio entre dos células contiguas impidiendo la libre circulación de moléculas. Las uniones estrechas, en la parte más apical de la membrana, están constituidas por tres tipos de proteínas transmembrana diferentes: las claudinas, las ocludinas y las JAMs (“junction adhesion molecules”). Todas ellas interaccionan homofílicamente con la célula adyacente, e intracelularmente con un conjunto de proteínas citosólicas que las anclan al

citoesqueleto. Por último, las uniones adherentes, también en la parte apical pero justo debajo de las uniones estrechas, están formadas por la proteína transmembrana cadherina, que se une a las cadherinas de la célula contigua (Hawkins and Davis, 2005).

- **MEC:** está compuesta por colágeno IV, laminina, fibronectina, elastina y diferentes proteoglicanos; rodea al endotelio y pericitos, constituyendo su soporte físico.

- **Pericitos:** grupo de células contráctiles que se localizan entre las ECs, astrocitos y neuronas y prácticamente incluidos en la lámina basal (Fisher, 2009). Estos proporcionan soporte a otros componentes de la UNV y mantienen las funciones fisiológicas normales de la BHE (Hill et al., 2014; Liu et al., 2012a). Aunque su función exacta es objeto de debate, parece que intervienen en la angiogénesis (Armulik et al., 2005), y regulan la permeabilidad vascular (Dore-Duffy and LaManna, 2007), el control del flujo sanguíneo por su contracción (Peppiatt et al., 2006) e incluso funciones de reparación tras un daño (Cai et al., 2017).

- **Astrocitos:** los pies astrocitarios se encuentran recubriendo más del 90% de la superficie de la microvasculatura y son esenciales para la formación de la BHE, interviniendo en la formación de las uniones estrechas (Abbott et al., 2006) y en la regulación del flujo sanguíneo cerebral (Koehler et al., 2006).

- **Neuronas y microglía:** Aunque no forman la BHE propiamente dicha, tienen capacidad para alterarla. Por un lado, las neuronas inervan directamente los vasos sanguíneos interviniendo en la regulación del tono (Hamel, 2006). Por otro, la microglía puede alterar la permeabilidad de la BHE secretando citoquinas, quimioquinas, EROs/ERNs y proteasas (Ronaldson and Davis, 2012; Stamatovic et al., 2005).

4.2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA

La TH producida tras una enfermedad cerebrovascular ocurre fundamentalmente cuando aumenta la permeabilidad de la BHE. Los mecanismos moleculares que desencadenan el proceso de disrupción de la BHE son complejos y no se conocen con detalle, siendo en la actualidad una de las áreas de estudio más

interesantes no sólo en el campo del ictus (para revisión ver (Jin et al., 2010b; Sandoval and Witt, 2008; Wang and Lo, 2003)), sino también en otras enfermedades neurodegenerativas (para revisión ver (Zlokovic, 2008)). Debido a que las vías subyacentes a la TH son complejas y diversas, los mecanismos que alteran la BHE durante la isquemia se pueden agrupar en cuatro bloques: los desencadenados por la propia respuesta vascular, por el estrés oxidativo (para revisión ver (Fraser, 2011)), por proteólisis y los derivados de la inflamación (para revisión ver (Wang et al., 2015)). Todos ellos confluyen en la degradación de la MEC por un lado y la alteración de las proteínas de unión por otro (Figura 8).

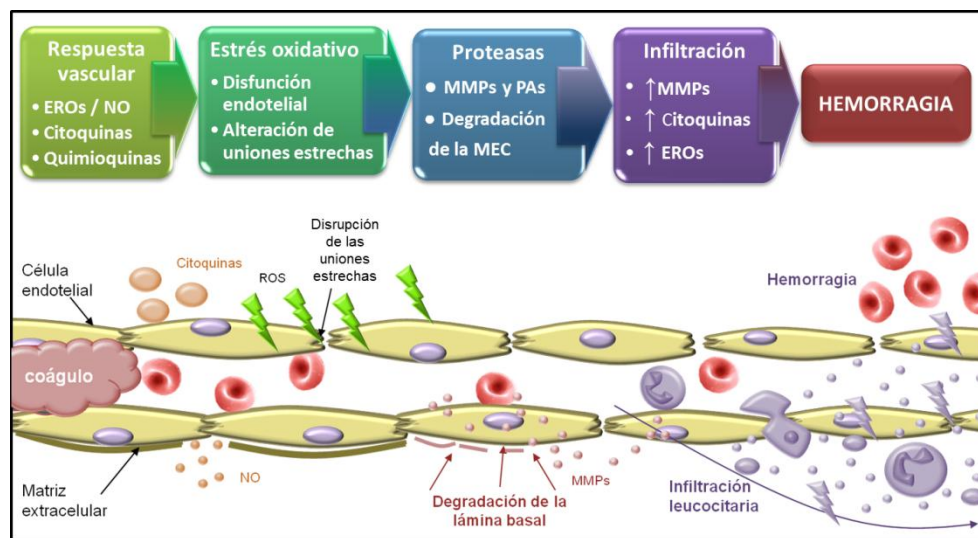


Figura 8. Mecanismos de transformación hemorrágica. MMPs (metaloproteasas de matriz), Pas (proteasas), NO (óxido nítrico), EROs (especies reactivas de oxígeno).

4.2.1. Alteración de la BHE por estrés oxidativo

Cada vez es más claro que el estrés oxidativo juega un papel importante en la desregulación de la BHE durante la TH en el cerebro isquémico, ya que se ha demostrado que la inyección de especies oxidantes induce edema cerebral (Chan et al., 1984), seguido de la extravasación proteica al parénquima; por el contrario, el tratamiento con antioxidantes reduce significativamente la TH (Martz et al., 1989; Woodfin et al., 2011). En modelos trombóticos, donde se induce la TH por administración de t-PA, también se ha demostrado la eficacia de estos antioxidantes (Asahi et al., 2000). De hecho, la generación de EROs/ERNs y el daño oxidativo en la

BHE se reconoce como el principal desencadenante de TH tras isquemia focal transitoria (Gursoy-Ozdemir et al., 2004). Además, estas especies se producen principalmente en el endotelio (Kontos et al., 1992), y están elevadas en los grupos de riesgo de TH en situaciones basales, indicando una disfunción endotelial previa a la isquemia (Olmez and Ozyurt, 2012). En el sistema nervioso central, el estrés oxidativo intenso y prolongado provoca la sobreexpresión y liberación de citoquinas proinflamatorias, que regulan la expresión de MMPs (Krizanac-Bengez et al., 2006), especialmente la MMP9 (Haorah et al., 2007).

4.2.2. Alteración de la BHE por proteólisis

Los datos emergentes sugieren que la TH tras terapia con t-PA puede estar relacionada con la proteólisis extracelular desregulada en la UNV (del Zoppo and Mabuchi, 2003; Lo et al., 2004). La degradación de los componentes básicos de la BHE produce fugas y rupturas, lo que agrava el edema cerebral y aumenta el daño (Zan et al., 2014). La evidencia estructural demuestra que el mecanismo básico que conduce a la extravasación de sangre es la alteración de la BHE. Aunque muchas proteasas se expresan en el cerebro en condiciones normales e isquémicas, entre las proteasas que se inducen durante la isquemia, como las catepsinas o las heparanasas, y de acuerdo a diferentes estudios tanto en animales como en humanos, son la familia de las metaloproteinasas de matriz (MMP) y el t-PA los que desempeñan un papel principal (Rosell et al., 2008).

Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de cinc (para revisión ver (Rosenberg, 2002)), entre las que destacan las MMP-9, 2 (colagenasas) y 3 (degrada laminina). Estas enzimas son sintetizadas en forma inactiva por prácticamente todas las células del SNC, abundando especialmente en endotelio, microglía y células inmunes infiltradas (del Zoppo et al., 2007). En los últimos 10 años, se ha demostrado que la expresión de MMP-2, MMP-3 y MMP-9 aumenta rápidamente en el cerebro isquémico, y que el aumento de estas actividades de MMP está estrechamente relacionado con la extensión del infarto, los déficits neurológicos y la TH (Rosell et al., 2006). Existe la evidencia directa de que los

niveles de MMP-2 están fuertemente relacionados con la degradación de las proteínas de uniones estrechas, la lámina basal y la lesión neuronal después de la isquemia (Lu et al., 2013). MMP-2 (MMP constitutiva) desempeña un papel clave en la apertura inicial de la BHE después de la isquemia (Chang et al., 2003; ElAli et al., 2011). De las MMPs, MMP-9 ha sido la más ampliamente estudiada en la ECV isquémica aguda. La actividad de MMP-9 está significativamente elevada en el tejido cerebral humano y en el suero tras isquemia, y los niveles séricos elevados de esta proteína pueden pronosticar TH en los pacientes tratados con t-PA (Castellanos et al., 2003; Inzitari et al., 2013). No solo esto, si no que cuando el nivel plasmático de MMP-9 aumenta significativamente en la fase aguda del ictus isquémico es capaz de correlacionarse con la gravedad de la enfermedad y el volumen de infarto de los pacientes (Demir et al., 2012). Además, la concentración de ARNm de la MMP-9 se ha visto triplicada en personas que murieron tras sufrir un ictus, en comparación con las que sobrevivieron (Graham et al., 2012). Por lo tanto, el aumento de ARNm de esta proteína puede predecir una peor recuperación y una mayor mortalidad. Por otro lado, la MMP-9 liberada por los neutrófilos infiltrados parece contribuir de forma significativa a la disrupción de la BHE (Gidday et al., 2005; Justicia et al., 2003; Ludewig et al., 2013; Rosell et al., 2008), lo que facilita la extravasación de más células blancas.

En cuanto al t-PA, se sabe que se expresa ampliamente en el SNC (Adibhatla and Hatcher, 2008) por neuronas y microglía entre otras células (Gualandris et al., 1996; Tsirka et al., 1997), y que, en las primeras horas tras la isquemia, se libera en los alrededores de la vasculatura (Yepes et al., 2003). En este contexto, se ha postulado que tras desarrollarse una lesión excitotóxica se encarga de mediar la muerte neuronal y la activación microglial (Siao et al., 2003). Además de su impacto en el compartimiento intravascular, el t-PA exógeno puede atravesar la BHE intacta (Benchenane et al., 2005) o dañada tras el ictus, donde produce efectos neurotóxicos (Vivien et al., 2011). Existen evidencias muy sólidas de que el t-PA puede aumentar y activar a varios miembros de la familia MMP (especialmente MMP-3 y MMP-9) (Rosell et al., 2008). De hecho, existe la hipótesis, generalmente aceptada y apoyada por la evidencia experimental, de que "el t-PA induce la

expresión de MMP-9” (Lo et al., 2004). Algunos estudios *in vivo* han demostrado que la terapia trombolítica con t-PA tras isquemia experimental aumenta los niveles de MMP-9, y que el t-PA combinado con inhibidores de las MMPs puede reducir la TH y el daño cerebral (Sumii and Lo, 2002).

Así, mientras parece que el t-PA endógeno podría participar en el proceso excitotóxico acelerando la muerte del tejido isquémico, la administración intravascular del fármaco, si produce reperusión (especialmente cuando es temprana), impide la progresión del daño isquémico, aunque no se pueda descartar que parte se extravase al parénquima cerebral y exacerbe la muerte excitotóxica, aunque sólo en la zona comprometida (para revisión ver (Harston et al., 2010; Kaur et al., 2004)).

4.2.3. Alteración de la BHE por infiltración leucocitaria

Los procesos de reclutamiento, activación e infiltración de leucocitos pueden desempeñar un papel fundamental en el proceso de la TH. Con la interacción entre leucocitos inflamatorios y células endoteliales del cerebro, las moléculas de adhesión tales como V-CAM y/o I-CAM pueden contribuir a la formación a la disfunción endotelial y daño celular (Harris et al., 2005). Las respuestas inflamatorias se manifiestan cuando los leucocitos se infiltran en el cerebro isquémico y empiezan a expresar y/o activar otras proteínas tales como selectinas, citoquinas, integrinas y MMPs (Wang et al., 2007). Las dos principales citoquinas proinflamatorias que se liberan de forma temprana tras la isquemia, IL-1 (Holmin and Mathiesen, 2000) y TNF- α (Hosomi et al., 2005), median acciones directas sobre la barrera y contribuyen a su disrupción. Los neutrófilos (Rosell et al., 2008) y los monocitos se van a adherir a las paredes vasculares y a extravasarse, contribuyendo de forma determinante al daño de la BHE y a la desorganización de las uniones estrechas (Bolton et al., 1998), ya que liberan especies oxidantes, citoquinas y proteasas durante el proceso. Además, parece que durante la infiltración de estas células se produce algún tipo de interacción con las JAMs de las uniones estrechas, lo cual contribuye a la apertura de la BHE (Weber et al., 2007).

4.3. TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA EN LA ISQUEMIA EXPERIMENTAL

Puesto que la TH es la complicación más grave de la terapia trombolítica intravenosa y el principal motivo por el que se excluyen a muchos pacientes de esta terapia, son necesarios muchos estudios para averiguar cuáles son los mecanismos moleculares específicos que inducen la degradación de la BHE, y así poder diseñar fármacos dirigidos a frenar este proceso. El objetivo de conseguir impedir la TH o identificar los factores de riesgo propios de la ruptura de la BHE, no sólo conllevaría que muchos más pacientes pudieran beneficiarse de la trombolisis, sino que abriría una nueva esperanza para los fármacos neuroprotectores, esta vez en combinación con terapias de reperfusión. Estos fármacos, además, podrían ser de interés para otras terapias de recanalización cada vez más utilizadas, como la trombectomía. Por lo tanto, es realmente importante avanzar en el conocimiento de este proceso, y poder trasladar de la investigación básica a la clínica, para lo cual se necesitan modelos experimentales diseñados para simular lo mejor posible lo que ocurre durante un ictus en el ser humano, que permitan la reperfusión con t-PA y que produzcan el fenómeno de la TH.

Los **modelos experimentales** de isquemia presentan varios problemas, aún más evidentes cuando el modelo pretende emular TH. En este contexto, la mayoría de los autores han utilizado un modelo en el que la oclusión se realiza mediante un filamento intraluminal, utilizando animales de experimentación que presentan alguno de los factores de riesgo de TH. De este modo, la hipertensión (empleando ratas espontáneamente hipertensas (Crumrine et al., 2011)), la obesidad (McColl et al., 2010), el tratamiento anticoagulante previo (Pfeilschifter et al., 2012) y la diabetes (hiperglucemia por inyección de glucosa o dextrano (Hu et al., 2011)) han mostrado que agravan los sangrados empleando este modelo.

En otro modelo empleado, como el modelo tromboembólico o de sangre autóloga (Kudo et al., 1982), y que consiste en alojar un coágulo preformado en la base de la arteria cerebral media (ACM) en lugar de un filamento, la reperfusión puede ocurrir de forma espontánea o bien lograrse administrando t-PA. Aunque este modelo basado en la formación de coágulos está más cerca de lo que sucede

en los pacientes, una limitación es la falta de reproducibilidad y uniformidad en el tamaño y localización de los infartos, porque la colocación y el alojamiento final de los múltiples émbolos no están controlados. Lo mismo ocurre en el modelo el fototrombótico, que consiste en la inyección de un colorante, el rosa de bengala, y en la posterior iluminación de la ACM para inducir la coagulación y la consecuente isquemia (Matsuno et al., 1993). Además, los émbolos inducidos fotoquímicamente son ricos en plaquetas y carecen de fibrina y, por lo tanto, son menos accesibles a la trombólisis con tPA (para revisión ver (Willing, 2009)).

En 2007 se desarrolla un modelo de ratón basado en la oclusión tromboembólica *in situ* de la ACM mediante la inyección de un procoagulante como la trombina, para inducir la isquemia (Orset et al., 2007; Orset et al., 2016). Los autores mostraron que la reperusión espontánea se producía en un 15% de casos y que la administración temprana de t-PA conseguía la recanalización arterial y rescatar parte del tejido comprometido, reproduciendo así dos hechos clínicos. Además, al ser un modelo de infarto exclusivamente cortical, la supervivencia es muy elevada. No obstante, su principal inconveniente es que requiere craniectomía y que la arteria resulta dañada durante la inyección de trombina, aunque levemente, por lo que pueden aparecer sangrados extraparenquimales que son fácilmente detectables y excluibles. No es hasta el año 2010 cuando en nuestro grupo desarrollamos por primera vez un modelo tromboembólico *in situ* de isquemia cerebral experimental en ratón con TH por la administración tardía de t-PA (García-Yébenes et al., 2011). Este modelo presenta importantes ventajas frente a otros, puesto que presenta volúmenes de infarto muy reproducibles y predecibles según el territorio irrigado por la ACM, presenta una tasa de mortalidad baja y ofrece un gran potencial de traslación de la investigación básica al reproducir hechos observados en la clínica, tales como el beneficio de la reperusión temprana, la TH asociada a recanalización tardía (Castellanos et al., 2007), la reperusión espontánea por autólisis (Saqur et al., 2008) y la resistencia al tratamiento fibrinolítico (para revisión ver (Rha and Saver, 2007)). Otro aspecto muy importante es que el modelo ha sido desarrollado en ratones, facilitando así futuros estudios de mecanismos fisiopatológicos mediante la utilización de animales manipulados genéticamente.

Por todas estas razones, este modelo es el más óptimo para el estudio de TH tras la administración tardía intravenosa de t-PA, siempre y cuando se tengan en cuenta algunas limitaciones del modelo como: (1) la formación del coágulo es mediante la inyección directa de trombina; y aunque no se detecte ningún efecto adverso por este tratamiento, no se pueden descartar que algunos parámetros bioquímicos estén afectados por esta proteasa, especialmente los implicados en la formación del edema (Donovan et al., 1997; Xi et al., 2003); (2) en relación con la consideración anterior, el coágulo inducido por trombina es un émbolo fibrínico que contiene un número bajo de células y plaquetas (Orset et al., 2007), lo que indica que el modelo es adecuado para el estudio del tratamiento trombolítico fundamentalmente en el caso de infartos isquémicos de carácter cardioembólico, pero se requieren más estudios para determinar su validez como modelo en el caso de infartos aterotrombóticos; y (3) la administración retardada se ha fijado 3 horas tras la oclusión isquémica, un tiempo todavía seguro cuando se traduce a los seres humanos, muy probablemente debido a diferencias de la especie.

5. LA RESPUESTA INMUNE EN EL ICTUS

5.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa del huésped contra la infección de patógenos y el daño tisular. Esta respuesta juega un papel imprescindible en la evolución de la lesión cerebral isquémica, ya que forman parte de la misma diferentes mediadores solubles (citoquinas y quimioquinas) y células especializadas que han sido activadas en el propio parénquima cerebral o reclutadas de la periferia (Amantea et al., 2014; Courties et al., 2014; Kamel and Iadecola, 2012).

Diferentes estudios muestran que, tras una enfermedad cerebrovascular, el número de células sanguíneas blancas y la expresión de citoquinas y marcadores inflamatorios aumentan en las horas siguientes a la isquemia (o durante el episodio isquémico) (Figura 9) (Emsley et al., 2003; Offner et al., 2006).

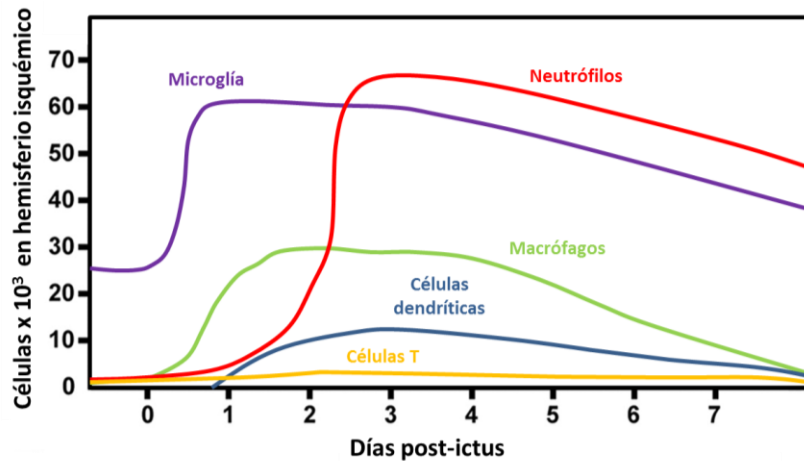


Figura 9. Dinámica del reclutamiento de células inflamatorias al cerebro isquémico de ratón. La gráfica muestra la infiltración de las principales células inflamatorias tras la isquemia (Modificado (Gelderblom et al., 2009)).

5.1.1. Activación de las células residentes: la microglía.

En el SNC, las primeras células inmunes en responder frente a daño o infección son las de la microglía. La liberación de ATP del tejido dañado y los astrocitos circundantes actúan como una señal local para mediar la respuesta microglial (Davalos et al., 2005). Además, la rotura de la vasculatura permite la entrada de proteínas de la sangre en el cerebro con la posterior formación de edema y daño neuronal en gran variedad de enfermedades neurológicas, incluida la enfermedad cerebrovascular. Por lo tanto, las señales tanto locales como periféricas median la activación temprana de la microglía tras un ictus isquémico. Esta activación está acompañada de cambios morfológicos que se han asociado estrechamente con actividades funcionales de la microglía, tales como la vigilancia (microglía ramificada) (Nimmerjahn et al., 2005) o con motilidad y fagocitosis (microglía ameboide) (Stence et al., 2001). Curiosamente, una microglía en forma de barra, cuyas funciones aún permanecen desconocidas, forma transitoriamente un conjunto de células alineadas de extremo a extremo en el sitio que ha sido dañado, estableciendo una barrera potencial entre el tejido saludable y el lesionado (Taylor et al., 2014; Ziebell et al., 2012). Además de estos cambios morfológicos, la microglía, especialmente la que se encuentra localizada en la región fronteriza del infarto,

aumenta su número de forma muy marcada. Los experimentos con ratones quiméricos de médula ósea indican que, después del aumento de células fagocíticas mononucleares, la proliferación microglial es el principal factor observado en el cerebro isquémico durante los primeros 3 días tras la oclusión de la ACM. Además, la infiltración masiva de macrófagos exógenos alcanza un pico a las 24-48 h tras la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) (Denes et al., 2007; Schilling et al., 2005). Sorprendentemente, estos macrófagos exógenos permanecen en el tejido isquémico hasta el último de los días evaluados en los estudios (14-28 días) y pruebas convincentes muestran que pueden integrarse en el parénquima después del daño (Mildner et al., 2007); sin embargo, hoy en día sigue sin estar claro si estas células pueden adquirir un fenotipo microglial funcional. Algunas evidencias muestran aspectos positivos de la microgliosis tras ictus (Denes et al., 2007; Faustino et al., 2011; Lalancette-Hébert et al., 2007); por ejemplo, la microglía puede modular la inflamación cerebral gracias a su potencial neuroprotector dependiente de la capacidad para producir moléculas neurotróficas tales como IGF - 1.

Por otro lado, la microglía es capaz de fagocitar residuos celulares, neutrófilos y células apoptóticas que secretan moléculas dañinas en el tejido dañado. Esta capacidad fagocítica en el cerebro isquémico predomina sobre la capacidad fagocítica de los macrófagos en el área de la lesión (Schilling et al., 2005). En este contexto, un estudio reciente de nuestro grupo revela que la expresión microglial de CD36, un receptor “scavenger” ligado a fagocitosis de células apoptóticas, está asociada a la fagocitosis de neutrófilos potencialmente apoptóticos en el tejido isquémico, contribuyendo así a la resolución de la inflamación y mediando en parte los efectos neuroprotectores tras ictus del agonista PPARgamma, rosiglitazona (Ballesteros et al., 2014b).

5.1.2. Infiltración de monocitos/macrófagos.

En los últimos años, varios trabajos que estudian la función de los macrófagos en los tejidos periféricos, como el pulmón o el hígado, han abierto el camino hacia la comprensión de la heterogeneidad y funcionalidad de estas células efectoras de la inmunidad innata. Así, se ha definido una fase “tóxica” inicial de la

respuesta inmune caracterizada por la expresión de moléculas proinflamatorias, como el TNF- α , la IL-12 o la IL-1 β . Esta respuesta inicial, que está principalmente mediada por el IFN- γ , se caracteriza por la aparición en el macrófago de un fenotipo denominado **clásico o M1**. Este fenotipo es claramente beneficioso para la defensa del huésped ante patógenos o daño, pero presenta un importante componente deletéreo en la isquemia cerebral (Terént et al., 2009). De manera fisiológica, el organismo es capaz de reducir esta fase tóxica inicial, resolver la infección o el daño y restaurar la homeostasis tisular. Una interesante forma de detener la fase dañina de la activación clásica del macrófago y de restaurar la homeostasis tisular después del daño es cambiar el estado de activación del macrófago desde un fenotipo proinflamatorio o M1 hacia un fenotipo que promueva la reparación y la reconstrucción tisular. Este estado del macrófago se denomina fenotipo **alternativo o M2**.

La activación alternativa del macrófago

El termino activación alternativa (M2) se adaptó tras asociar este estado de activación del macrófago con la respuesta inmune adaptativa Th2; de aquí que el término M2 también haya sido usado para describir este estado de activación (Mantovani et al., 2005; Mosser and Edwards, 2008). Así, las citoquinas IL-4 e IL-13, comúnmente asociadas a las respuestas Th2, son sus inductores prototípicos, aunque otras citoquinas anti-inflamatorias, como la IL-10 o el TGF- β , también son capaces de producir en el macrófago cambios sustanciales que lo diferenciarían de su fenotipo clásico M1. La realidad de esta nomenclatura dicotómica M1/M2 es que está muy alejada del verdadero espectro de estados de activación que pueden presentar los macrófagos. De hecho, dentro de la activación alternativa M2 hay una gran heterogeneidad, por lo que se han introducido nuevas subclasificaciones fenotípicas capaces de diferenciar los distintos subtipos de activación alternativa. Dentro de estos cambios, el más importante es el que propuso Mosser en 2003 al introducir un nuevo estado de macrófagos denominado “desactivación adquirida”, cuyos inductores serían principalmente la IL-10 y el TGF- β (Mosser, 2003). Así, siendo estrictos, una activación alternativa es la inducida por las interleuquinas IL-4 e IL-13, cuya principal función inmunológica está encaminada a la eliminación de parásitos,

mientras que la activación clásica o M1 tiene una función citotóxica, destinada a la eliminación de patógenos intracelulares. Pero, además, las actividades metabólicas y secretoras de los macrófagos activados alternativamente favorecen funciones tróficas más que líticas, la eliminación de cuerpos apoptóticos más que la inducción de necrosis y la inducción de tolerancia más que de autoinmunidad (Gordon and Martinez, 2010).

La base molecular de la heterogeneidad fenotípica y funcional del macrófago ha empezado a desvelarse mediante el análisis de los perfiles de expresión génica y de las funciones efectoras en diversas situaciones patológicas. Se han llevado a cabo un gran número de estudios para identificar marcadores fenotípicos claros capaces de distinguir una activación alternativa de una activación clásica. Estos análisis han revelado diferencias muy significativas entre los perfiles de expresión de los macrófagos murinos y humanos, lo que ha generado una importante controversia, dado que existe la necesidad de validar marcadores alternativos en ambas especies y exige que se tome con cautela la extrapolación de resultados obtenida en modelos animales a humanos. Tal es el caso de la arginasa I o la quitinasa Ym1, los cuales no pueden considerarse un buen marcador de fenotipo alternativo en humano, pero sí en el ratón (Raes et al., 2005).

Mientras que se conoce mucho sobre estas células y su fenotipo más resolutivo, este proceso es menos conocido en el SNC. La complejidad del sistema mieloide, en términos de tipos celulares y plasticidad, hace fundamental la distinción de las respuestas neuro-inflamatorias para determinar no solo su naturaleza y su papel en la isquemia, sino también en la eficacia de su modulación. En este contexto, un número creciente de evidencias experimentales sugieren que la microglía residente puede ser funcionalmente distinta de las células fagocíticas derivadas de la sangre, pero la falta de marcadores específicos de microglía ha hecho muy difícil discriminar entre microglía y células mieloides infiltradas tras isquemia y poder entender las funciones diferenciales de estos tipos celulares. Como se ha indicado anteriormente para los macrófagos, y a pesar de su ontogenia diferente, algunos estudios sugieren que la microglía también tiene una activación similar M1/M2. En modelos animales de diferentes patologías del SNC tales como

ictus, lesión cerebral traumática o lesión de la médula espinal, la microglía y/o los macrófagos pasan de un fenotipo M2 transitorio a M1 fagocítico y la modulación de esta activación M1/M2 ha sido propuesta como una opción terapéutica potencial en el tratamiento de estas enfermedades (Cherry et al., 2014). En la isquemia cerebral, una activación M2 de diferentes células mieloides coexiste con la fase inicial proinflamatoria M1 del ictus. Este efecto se evidencia por estudios experimentales que han caracterizado la presencia y la regulación positiva de los marcadores M2 en el cerebro isquémico (Hu et al., 2012; Perego et al., 2011; Zarruk et al., 2012). Específicamente, la modulación de los fenotipos M1 y M2 en microglía/macrófagos se ha relacionado con acciones perjudiciales y neuroprotectoras tras ictus, respectivamente (Hu et al., 2012; Shechter et al., 2009). Pero existe un enfoque aceptado que se basa en la observación de que, a diferencia de los macrófagos, la microglía expresa niveles bajos o intermedios del marcador de leucocitos CD45. Esto permite la caracterización de microglía por citometría de flujo usando los niveles de expresión de CD45 en células positivas a CD11b, un marcador mioide expresado de forma similar tanto en poblaciones residentes como no residentes (Ballesteros et al., 2014a; Campanella et al., 2002).

Los monocitos se infiltran de manera muy temprana y masivamente al parénquima isquémico (Denes et al., 2007; Schilling et al., 2005), pero hay controversia entre su posible papel deletéreo o neuroprotector en esta patología. Su efecto perjudicial se ha estudiado en ictus, donde se ha observado que ratones que carecen del receptor de quimioquinas CCR2 están protegidos contra la lesión de isquemia-reperfusión y presentan un número reducido de monocitos y neutrófilos en el tejido isquémico (Dimitrijevic et al., 2007). Sin embargo, existen estudios que indican que los monocitos CCR2+ también pueden desempeñar un papel beneficioso en la lesión del SNC. Esto se ejemplifica en los modelos murinos de lesión de la médula espinal, donde el reclutamiento de los monocitos CCR2+ se ha asociado a la recuperación funcional (Shechter et al., 2009) o en modelos de isquemia cerebral, donde los monocitos CCR2+ mantienen la integridad de la unidad neurovascular (Gliem et al., 2012). Además, los últimos estudios señalan que monocitos Ly6C (hi) CCR2+ ejercen un efecto protector agudo tras ictus experimental ya que limitarían la

lesión cerebral y el déficit funcional que implica la promoción de la polarización de los macrófagos M2 (Chu et al., 2015); además, su reclutamiento al cerebro lesionado contribuiría a la recuperación funcional a largo plazo, mediante su actividad de resolución de la inflamación (Wattananit et al., 2016).

5.1.3. Infiltración de neutrófilos.

Los neutrófilos, también conocidos como leucocitos polimorfonucleares (PMNs) tiene un papel fundamental en la respuesta inmune innata. Constituyen el 10% aproximadamente del total de leucocitos en la sangre murina y son los leucocitos circulantes más abundantes en la sangre humana (hasta el 70%) (Mestas and Hughes, 2004). Se producen en los nichos hematopoyéticos de la médula ósea (Borregaard, 2010), donde maduran y se equipan con numerosos gránulos que contienen proteínas críticas para el desarrollo de la respuesta inflamatoria (Häger et al., 2010). Tras su completa maduración, los neutrófilos son liberados a la circulación sanguínea y/o se concentran en múltiples órganos (incluyendo la médula ósea, el bazo y el pulmón) que podrían actuar como reservorios de neutrófilos maduros (Summers et al., 2010).

En condiciones fisiológicas, los neutrófilos circulantes tienen una vida corta (Kolaczkowska and Kubes, 2013) y sufren apoptosis espontánea probablemente un día tras incorporarse a la circulación (Geering and Simon, 2011) con la consecuente eliminación a través del bazo, el hígado y la médula ósea (Hong et al., 2012; Shi et al., 2001). Sin embargo, los neutrófilos se activan durante la inflamación y reciben numerosas señales que incrementan su tiempo de vida comparados con los neutrófilos no activados (Colotta et al., 1992). Más interesante todavía es el hecho de que los neutrófilos maduros pueden proliferar fuera de la médula ósea para favorecer su persistencia en los tejidos inflamados (De Santo et al., 2010; Kim et al., 2011).

La **activación neutrofílica** culmina con su migración a través del vaso sanguíneo hacia el tejido lesionado (Ley et al., 2007; Nourshargh et al., 2010). Ejerce distintas funciones como son contribuir a la resolución de la inflamación, a la patología inmune asociada con la inflamación o a la modulación de la respuesta

inmune adaptativa (Borregaard, 2010; Kolaczowska and Kubes, 2013; Mócsai, 2013). En este contexto, las células polimorfonucleares llevan a cabo mecanismos sofisticados para ejercer su complejo papel en el sistema inmune. Estas funciones han sido bien documentadas y caracterizadas durante la infección aguda (Borregaard, 2010). Así, estas células son capaces de fagocitar patógenos (Nordenfelt and Tapper, 2010) y eliminarlos dentro del fagosoma mediante la liberación de EROs generadas por la actividad de la enzima NADPH (Leto and Geiszt, 2006) y del contenido de los gránulos intracelulares (Borregaard et al., 2007; Borregaard, 2010; Häger et al., 2010). Asimismo, las células PMNs podrían ser capaces de expulsar el contenido nuclear y liberarlo en forma de trampa extracelular neutrofílica (NET, “*neutrophil extracellular traps*”) que les permite eliminar a los patógenos sin llevar a cabo la fagocitosis (Brinkmann et al., 2004).

Los neutrófilos también juegan un papel esencial en patologías que cursan con inflamación estéril como la isquemia cerebral, el infarto, el trauma, las enfermedades metabólicas y los procesos autoinmunes, entre otras, donde los tejidos están lesionados en ausencia de infección (Kono and Rock, 2008). En este tipo de respuestas, las funciones fagocíticas de los neutrófilos contribuyen a la eliminación de las células necróticas e implican una reacción homeostática del tejido dañado. Sin embargo, hasta que son reclutados al tejido dañado, su arsenal destructivo puede causar una destrucción colateral del tejido (McDonald et al., 2010).

En el contexto del ictus, existen numerosos estudios que evidencian la acumulación de neutrófilos en las áreas del cerebro isquémico, aunque sus efectos beneficiosos o nocivos todavía están siendo investigados. Los datos de los estudios preclínicos demuestran que los neutrófilos alteran la homeostasis de la microcirculación causando lo que se ha denominado como el fenómeno de “no reflujo” (*no-reflow phenomenon*) (Ames et al., 1968), contribuyendo al daño del tejido. Estas células también alteran la BHE mediante la liberación de MMP-9, que degrada la matriz extracelular (Li et al., 2014) y contribuye a la degradación del tejido mediante la secreción de elastasas (Ikegame et al., 2010). También son capaces de generar ERO/ERNs mediante el “estallido” respiratorio de la NADPH

oxidasa (Chen et al., 2009) y por la NO sintasa inducible (Garcia-Bonilla et al., 2014), y que también contribuyen a producir un daño directo al endotelio vascular y al parénquima cerebral. De hecho, se han asociado múltiples estrategias antiinflamatorias y neuroprotectoras en el ictus con una menor infiltración de neutrófilos en el tejido isquémico (Segel et al., 2011). Además, la eliminación selectiva de neutrófilos mediante anticuerpos anti-PMNs tras la isquemia cerebral conlleva neuroprotección (Cuartero et al., 2013; Murikinati et al., 2010; Sreeramkumar et al., 2014). En consonancia con el papel deletéreo de los neutrófilos tras el ictus, numerosos estudios han encontrado una clara correlación entre el grado de infiltración y la gravedad de la lesión neurológica (Akopov et al., 1996; Price et al., 2004) (Akopov et al., 1996; Price et al., 2004).

El **perfil temporal** de la infiltración neutrofílica y su localización en el cerebro están todavía en debate. Se han descrito diferentes patrones de infiltración para los neutrófilos: en general, se piensa que estas células se infiltran rápidamente al cerebro isquémico a partir de las primeras horas tras la isquemia, alcanzando sus niveles de infiltración máxima entre los días 1 y 3 tras el establecimiento del infarto y disminuyendo su número con el paso del tiempo (Chu et al., 2015; Cuartero et al., 2013; Grønberg et al., 2013; Jin et al., 2010a; Kriz, 2006; Möller et al., 2014). Recientemente, utilizando microscopía intravital, que proporciona más pruebas de la infiltración de los neutrófilos en el parénquima cerebral tras el ictus, se ha demostrado que los neutrófilos circulantes responden de forma temprana a la activación endotelial producida por el evento isquémico (Neumann et al., 2015). Los diferentes perfiles temporales que se encuentran en la literatura posiblemente se deban al uso de distintos modelos experimentales de ictus (transitorio vs. permanente, o modelo de filamento vs. ligadura), lo cual puede influenciar en su reclutamiento (Ballesteros et al., 2014b; Möller et al., 2014).

Aunque los neutrófilos están constitutivamente equipados con receptores que median interacciones con la microvasculatura inflamada, los neutrófilos activados sufren un cambio rápido desde una **morfología** simétrica a una polarizada tras la inflamación. Este fenómeno parece ser esencial para la migración directa durante la extravasación y la migración tisular (Barreiro et al., 2007; Nacher and

Hidalgo, 2011; Ridley et al., 2003). El proceso de polarización implica cambios morfológicos como el paso de una forma redonda a una alargada (con dos regiones diferenciadas, el lado que lidera el movimiento celular y el urópodo o lado trasero), la segregación de moléculas en el citoplasma y la traslocación de receptores transmembrana hacia la superficie celular, de tal manera que las integrinas activadas y distintos receptores transmembrana de quimioquinas se acumulan en el lado frontal mientras que en el lado trasero se concentran ligandos de integrinas y selectinas como PSGL-1, CD43, CD44 e ICAM-1 (Alonso-Lebrero et al., 2000; Nacher and Hidalgo, 2011). Este proceso, junto con la inducción de la adhesión molecular a la superficie de la célula endotelial, es suficiente para iniciar las interacciones entre los neutrófilos y el endotelio lesionado.

Un elemento fundamental de la cascada es la P-selectina, que se expresa fundamentalmente en las células endoteliales. De hecho, la P-selectina está implicada en el anclaje y “rolling” de los neutrófilos circulantes mediante la unión a PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) (Yang et al., 1999). Las terapias que tienen como diana la P-selectina han demostrado ser efectivas en diferentes modelos experimentales. Así, tras isquemia cerebral transitoria, los animales que carecen de P-selectina muestran una reducción del volumen de infarto y un mejor resultado funcional (Connolly et al., 1997); de forma similar, los anticuerpos frente a la P-selectina reducen el tamaño del infarto tanto en modelo de isquemia permanente como transitoria (Goussev et al., 1998; Suzuki et al., 1999). La P-selectina es más abundante en los gránulos alfa de las plaquetas que en las células endoteliales (Wagner and Frenette, 2008), lo que sugiere que los neutrófilos podrían unirse a plaquetas activadas y esto podría facilitar el reclutamiento de células PMNs durante la lesión cerebral aguda. En consonancia con esta idea, estudios previos han demostrado que ratones tratados con anticuerpos frente a la P-selectina o deficientes en esta molécula en sus plaquetas o en las células endoteliales muestran una inhibición de la adhesión neutrofílica en las vénulas del cerebro post-isquémico y del reclutamiento de las plaquetas adherentes (Ishikawa et al., 2004).

Estos datos coinciden con el modelo de reclutamiento de plaquetas que implica la unión de la plaqueta a los leucocitos, los cuales se unen a las paredes de

las vénulas. También en esta dirección, se ha demostrado recientemente el impacto funcional de la reorganización dinámica de los dominios neutrofílicos y su interacción con las plaquetas y la vasculatura inflamada en ictus (Sreeramkumar et al., 2014), donde la interacción entre neutrófilos y plaquetas en la microvasculatura de los cerebros infartados se inhibió mediante el bloqueo de PSGL-1, lo que mostró una disminución significativa del volumen de infarto. Debido a que los neutrófilos pueden rodar sobre plaquetas depositadas y transmigrar de forma similar a como lo hacen con las células endoteliales (Nacher and Hidalgo, 2011), este mecanismo puede facilitar el reclutamiento neutrofílico hacia la pared del vaso y subsecuentemente su infiltración al tejido dañado.

Otra diana de interés para interferir en la inflamación neutrofílica tras el ictus son las integrinas LFA1 (CD11a/CD18) y Mac1 (CD11b/CD18), las cuales median la adhesión firme del neutrófilo mediante la unión a ICAM1 e ICAM2 expresadas en las células endoteliales, así como el eje VLA-4/VCAM-1 (Neumann et al., 2015; Segel et al., 2011). Sin embargo, aunque es prometedor, el bloqueo de estas moléculas con anticuerpos específicos tanto en estudios preclínicos como clínicos no ha presentado en todos los casos efectos beneficiosos en la resolución del ictus (del Zoppo, 2010; Langhauser et al., 2014; Prestigiacomo et al., 1999; Zhang et al., 2003).

A pesar de la demostrada **heterogeneidad** de muchas otras líneas de leucocitos, los neutrófilos se han considerado una población homogénea. Esta concepción está empezando a cambiar y se están describiendo nuevas funciones de subpoblaciones específicas de neutrófilos, incluyendo propiedades antiinflamatorias, angiogénicas o pro-resolutivas (Dalli et al., 2008; Fridlender et al., 2009; Pillay et al., 2012; Zhang et al., 2009). En esta misma línea, los neutrófilos también han mostrado heterogeneidad funcional *in vivo* y capacidad para cambiar su fenotipo tras la exposición *in vitro* a citoquinas (Mantovani et al., 2011), función que les permite responder a estímulos extracelulares de forma contexto-dependiente (al-Essa et al., 1995; Chakravarti et al., 2009; Fridlender et al., 2009; Puellmann et al., 2006; Zhang et al., 2009). Recientemente, estos hechos han sido destacados en la patología del cáncer, donde se ha demostrado que los neutrófilos asociados a tumores pueden adquirir un fenotipo pro-tumor (N2) caracterizado por

la expresión de arginasa I, CCL2 y CCL5 (Fridlender et al., 2009). En el contexto de la isquemia, en 2013, nuestro grupo describió por primera vez, que la población de neutrófilos infiltrados en el parénquima isquémico constituye una población heterogénea, ya que algunos de ellos expresaban los marcadores típicos de la activación alternativa o M2 de macrófagos. Además, observamos que los neutrófilos N2 del tejido isquémico facilitan su propia fagocitosis por los macrófagos/microglia, hecho que puede promover la resolución de la inflamación después de la enfermedad cerebrovascular (Cuartero et al., 2013).

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, la translacionalidad potencial de dirigir neutrófilos *per se* o su tráfico después de una enfermedad cerebrovascular todavía no está bien establecida. Tal vez, el bloqueo de las interacciones de neutrófilos con otras células como las plaquetas, la modulación del fenotipo resolutorio de neutrófilos o el direccionamiento específico de uno pero no todos los tipos de neutrófilos podrían proporcionar nuevas vías terapéuticas para el tratamiento agudo de la enfermedad cerebrovascular.

5.1.4. Infiltración de linfocitos.

El reclutamiento de linfocitos T está implicado en las etapas más tardías del daño cerebral isquémico (Stevens et al., 2002). El pico de infiltración de estas células se da principalmente alrededor del día 3 y se mantiene hasta el día 7 (modelo tromboembólico). Los dos subconjuntos de células T son las células T citotóxicas (Tc), que son capaces de aumentar el tamaño de infarto ya que atacan tanto al tejido dañado como al sano que hay alrededor, y las células T helper (Th), que también aumentan la reacción inflamatoria activando macrófagos y promoviendo la producción de anticuerpos por las células B. Además, las células Th constan de diferentes subpoblaciones que incluyen las células Th1, que están más implicadas en la inmunidad mediada por células y que liberan mediadores pro-inflamatorios IL-2, IL-12, TNF- α e IFN- γ (Yilmaz et al., 2006), las células Th2, que promueven inmunidad humoral y producen citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-13 (Liew, 2002; Pelidou et al., 1999) y, por último, las células Treg, que tienen efectos supresores generalizados sobre otros linfocitos y secretan citoquinas anti-inflamatorias como

TGF- β e IL-10 (Scheffold et al., 2007). Los linfocitos tienen una función crucial en los procesos inflamatorios y están estrechamente relacionados con los efectos deletéreos en el ictus. Este hecho se comprobó tras la administración del inmunosupresor fingolimod que, entre otros efectos, inhibe la infiltración de células T en el tejido inflamatorio, y reduce los volúmenes de infarto en modelos de isquemia en ratón (Macrez et al., 2011).

5.2 MEDIADORES MOLECULARES DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA: “RECEPTORES TOLL-LIKE”

5.2.1. Origen, estructura y ligandos

Los receptores *toll-like* (TLRs) son una familia de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) responsables de la identificación de patrones moleculares conservados asociados a patógenos (PAMPs) o a daño celular (DAMPs). Los TLRs se identificaron inicialmente en *Drosophila melanogaster* como receptores *Toll*, por su papel en el establecimiento de la polaridad dorsoventral durante el desarrollo embrionario (Hashimoto et al., 1988). Posteriormente, a finales de los '90, se descubren por primera vez los homólogos en mamíferos que fueron llamados receptores tipo toll (“toll-like”) (Medzhitov et al., 1997). No es hasta la siguiente década cuando se caracterizan (para revisión ver (Carty and Bowie, 2011; Iwasaki and Medzhitov, 2004). Sin embargo, la primera demostración de que este receptor estaba implicado en la inmunidad del huésped se dio en 1996 cuando se observó que las moscas *Drosophila* deficientes en *Toll* eran vulnerables a experimentar infecciones por ciertos hongos (Lemaitre et al., 1996).

Estructuralmente, los TLRs son receptores glicoproteicos integrales de membrana tipo I, constituidos por 3 componentes principales: (1) un dominio extracelular N-terminal rico en leucina, responsable de unirse al ligando, que forma una superhélice “diestra” que se extiende a lo largo del dominio y adopta la forma de una herradura, (2) un dominio transmembrana, y (3) un dominio intracelular de señalización C-terminal conocido como Toll (IL-1R) (TIR, del inglés *Toll/interleukin-1*

receptor), que es homólogo al de la familia de receptores de IL-1 (Kondo et al., 2012). Sin embargo, no se asemejan en su porción extracelular, ya que los receptores de IL-1 poseen un dominio extracelular tipo inmunoglobulina, mientras que los TLRs se componen de las repeticiones ricas en leucina (Akira and Takeda, 2004; Kawai and Akira, 2010; O'Neill and Bowie, 2007). En humanos se han identificado 10 TLRs y en ratón 13 (Akira et al., 2006; Beutler et al., 2007; Mallard, 2012; Medzhitov, 2007). La expresión y localización de estos receptores puede ser célula-tejido dependiente aunque, en general, los TLR 1, 2, 4, 5, 6 y 11 se localizan en la membrana plasmática reconociendo así sus ligandos (PAMPs y DAMPs), mientras que otros se localizan intracelularmente en las membranas superficiales de endosomas, lisosomas o retículo endoplasmático (TLRs 3, 7, 8 y 9) (Bode et al., 2012; Kawai and Akira, 2010). Estos TLRs localizados en orgánulos intracelulares reconocen ácidos nucleicos extraños proporcionando así un nivel adicional de regulación para la activación de TLR. Los miembros de la familia TLR contribuyen tanto a las interacciones célula-célula como a la señalización que una señales extracelulares a programas de expresión de genes específicos. TLR4 es el único que requiere un co-receptor para unirse al ligando (Figura 10). Este co-receptor es una glicoproteína pequeña de unión a lípidos conocida como factor de diferenciación mieloide 2 (MD-2) (Park et al., 2009).

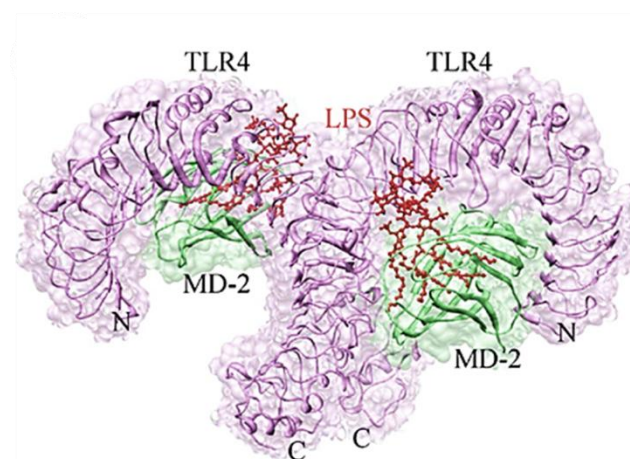


Figura 10. Estructura cristalizada del homodímero de TLR4. La dimerización de estos receptores es dependiente de unión a ligando. Como se observa en la figura los complejos formado por TLR4-MD2, interaccionan simétricamente para formar el homodímero de TLR4 (Modificado de (Manavalan et al., 2011)).

El primero de estos receptores que se describió fue precisamente **TLR4**. En 1998 se identificó una mutación en el gen TLR4 de distintas cepas de ratón que les provoca una respuesta reducida al lipopolisacárido (LPS) de la pared de las bacterias gram negativas (Poltorak et al., 1998). Desde entonces, los TLRs en mamíferos han sido un foco muy importante en el campo de la inmunología. Tanto es así que los autores de los dos trabajos mencionados anteriormente, Bruce Beutler (Poltorak et al., 1998) y Jules A. Hoffmann (Lemaitre et al., 1996), fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina en 2011 por estos hallazgos.

En relación a los **ligandos**, los receptores Toll de *Drosophila* y los receptores toll-like de mamíferos se han identificado como reguladores clave de la respuesta inmune actuando como centinelas, concretamente en el reconocimiento directo de agentes infecciosos, y que se lleva a cabo por la señalización a través de NF- κ B que conduce a la iniciación tanto de la respuesta inmune innata como de la adaptativa. Estos pueden ser activados por motivos específicos expresados en microorganismos tales como bacterias, hongos, parásitos y virus conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Tabla 2). Esta clase de moléculas incluye el LPS, un componente de pared celular de bacterias gram-negativas que es un ligando bien conocido para TLR4. Otros componentes de la pared celular bacteriana, tales como el ácido lipoteicoico y el peptidoglicano, son reconocidos específicamente por TLR2. Además del reconocimiento de patógenos exógenos durante la infección, los TLRs actúan como centinelas de daño celular activando una respuesta de "**inflamación estéril**" mediante la unión a ligandos endógenos. Estos DAMPs, liberados o modificados después de una lesión, como la fibronectina de la matriz extracelular, también incluyen moléculas que se encuentran en el compartimiento intracelular, tales como proteínas de choque térmico o ácido úrico, y moléculas de localización nuclear, como ADN o microRNA (Tabla 2) (Piccinini and Midwood, 2010). En el caso de TLR4, los DAMPs descritos son el fibrinógeno, las proteínas de choque térmico 60 y 70 (HSP60-70) y la proteína de alta movilidad del grupo B1 (HGMB-1) (Piccinini and Midwood, 2010). La implicación de DAMPs en el proceso llamado "inflamación estéril" apoya la visión de TLR4 como un receptor de centinela que se activa también por las señales de

peligro/daño en ausencia de patógenos (Mollen et al., 2006). La unión de cualquiera de los PAMPs o DAMPs a sus TLRs afines activa vías de señalización que eliminan las partículas extrañas o residuos de muerte celular, respectivamente. Este proceso promueve la homodimerización (TLR3 y TLR4) o la heterodimerización (TLR1, TLR2 y TLR6) del receptor que se inicia por enlaces cruzados entre ectodominios, los cuales a su vez provocan que los dominios de señalización intracelular de los receptores se aproximen. El dominio de señalización está compuesto por el dominio del receptor Toll-IL-1 (TIR), el cual está presente también en las proteínas adaptadoras intracelulares MyD88 y TRIF (para revisión ver (Gesue et al., 2014)).

TLR	Ligando PAMP	Ligando DAMP
TLR1	Lipoproteínas triaciladas	
TLR2	Peptidoglicanos Lipoproteínas Ácido Lipoteicoico Zymosan	Proteínas de choque térmico
TLR3	dsARN viral	dsARN propio
TLR4	Proteínas de choque térmico Lipopolisacáridos Proteína de fusión RSV Proteínas de la envuelta de MMTV (Virus de tumor mamario de ratón) Paclitaxel	Proteínas de choque térmico Fibrinógenos Heparán Sulfato Fibronectina Ácido Hialurónico HMGB1
TLR5	Fragelina	
TLR6	Ácido Lipoteicoico Lipoproteínas triaciladas Zymosan	
TLR7/TLR8	ssARN viral	ssARN propio
TLR9	DNA viral y bacteriano	DNA propio
TLR10	No identificados	
TLR11	Profilina	

Tabla 2. Ligandos de los TLRs. Principales ligandos de TLRs descritos. (Modificado de Fadakar et al., 2014) (Ver lista de abreviaturas)

5.2.2. Rutas de señalización de los TLRs

La respuesta específica iniciada por TLRs individuales depende del reclutamiento de una sola proteína adaptadora que contiene el dominio TIR o la combinación de éstas (MyD88, TIRAP, TRIF o TRAM) (Kawai and Akira, 2010). El factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88, del inglés *Myeloid differentiation factor 88*) es utilizado por todos los TLRs, excepto por TLR3. Esta proteína transmite señales hasta que activa NF- κ B y MAP quinasas y se induce la producción de citoquinas inflamatorias. TLR3 y 4 utilizan TRIF para activar una ruta alternativa que conduce también a la activación de NF- κ B e IRF3, la inducción de interferón tipo I y la producción de citoquinas inflamatorias (Takeuchi and Akira, 2010).

Concretamente, los elementos intracelulares de las vías de señalización de TLR-4 pueden variar en función del ligando implicado. Además, un ligando específico puede activar vías diferentes. Además, TLR4 es el único TLR que recluta las cuatro proteínas adaptadoras y activa dos rutas de señalización distintas que se explicarán a continuación: la ruta “dependiente de MyD88” y la ruta “independiente de MyD88” ó “dependiente de TRIF” (Figura 11) (Kawai and Akira, 2010).

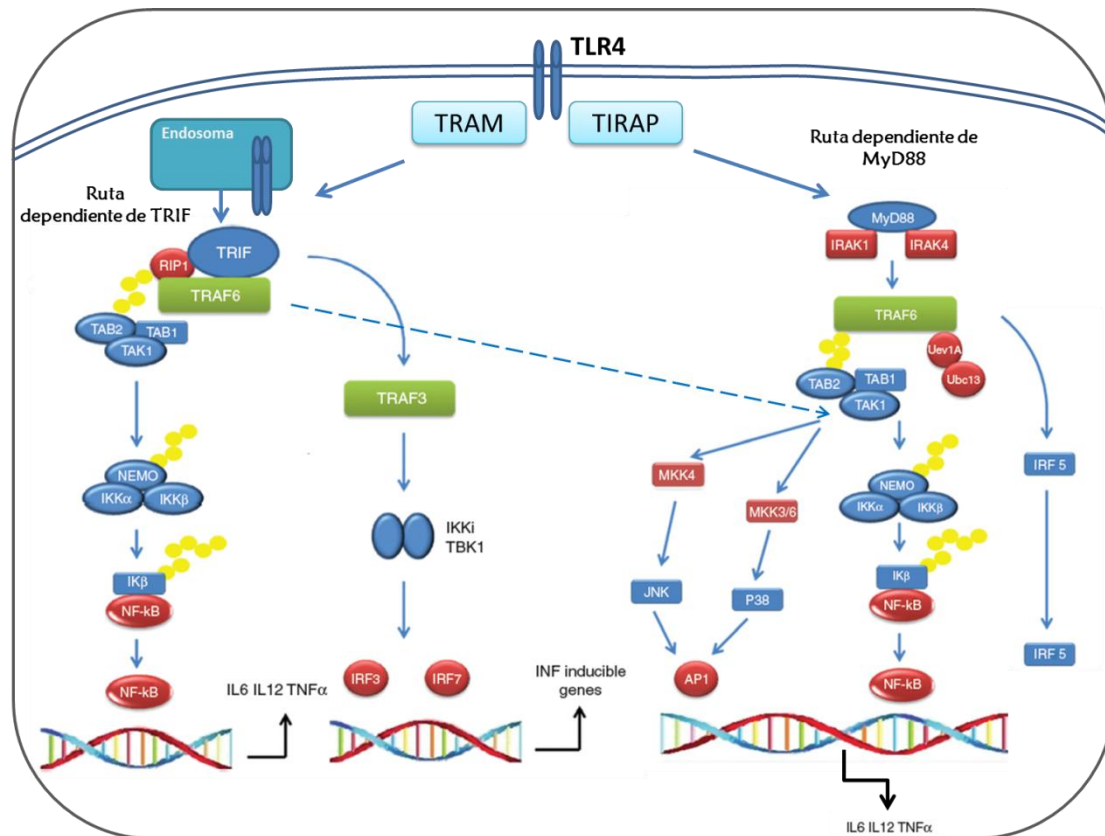


Figura 11. Rutas de señalización de TLR4. Tras la activación del receptor TLR4 por DAMPs o PAMPs, éste recluta y activa primero la ruta dependiente de MyD88, que inicia una cascada de señalización que produce la activación de AP-1 y NF-κB e induce la expresión de los genes de citoquinas proinflamatorias. La otra ruta inducida por la activación de TLR4, conocida como ruta retrasada, es dependiente de TRIF y activa NF-κB e IRF3, que promueve la inducción de genes proinflamatorios e interferones tipo I. (Figura adaptada de (Fadakar et al., 2014)).

El primer paso común a ambas rutas de señalización es el reconocimiento de la región A lipídica del LPS por el receptor TLR4 (Poltorak et al., 1998). El LPS circulante es capturado por la proteína de unión a LPS (LBP, del inglés *LPS binding protein*) y el dímero resultante se une a una tercera proteína denominada grupo de diferenciación 14 (CD14), que está presente en la membrana de las células del sistema inmune innato o de forma soluble en el plasma (Tobias et al., 1995). Una función de CD14 es el transporte de TLR4 a las regiones “*lipid rafts*” de la membrana celular, amplificando su señalización (Triantafilou et al., 2002). El siguiente paso es el reclutamiento del co-receptor MD-2 (Shimazu et al., 1999), fundamental para la translocación de TLR4 a la membrana celular (Nagai et al.,

2002); posteriormente, el complejo TLR-4/MD-2 será entonces endocitado (Fujihara et al., 2003). Una vez que el heterodímero CD14/TLR-4/MD-2 se asocia al LPS, se pueden desencadenar dos rutas de señalización alternativas (da Silva Correia et al., 2001).

Ruta dependiente de MyD88

TLR-4 se une a MyD88 a través de su dominio citoplasmático TIR y luego recluta la quinasa IRAK4 asociada a receptor de IL-1. IRAK4 une y activa el factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6). Esta triple asociación se llama Complejo-1 (Cao et al., 1996).

El Complejo-1 se disocia de TLR-4 y recluta un grupo de proteínas: TAK-1 (quinasa relacionada con TGF α) y TAB (proteína de unión a TAK1) 1, 2 y 3, constituyendo el Complejo-2. La interacción entre estas proteínas produce la fosforilación de algunas de ellas, permitiendo la activación de dos posibles sub-vías:

1.- La TAK-1 fosforilada activa IKK (I κ B quinasas complejas), que fosforila las proteínas I κ B (inhibidor de la kappa B), induciendo su degradación a través del proteasoma y permitiendo la translocación de NF- κ B al núcleo. NF- κ B regula la expresión de los genes que codifican para la vía pro-inflamatoria proteínas tales como las enzimas ciclooxigenasa 2 (COX-2) y óxido nítrico inducible sintasa (iNOS) o las citoquinas IL-1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Delaney et al., 2006).

2.- TRAF6 produce la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) ERK1/2, p38 y JNK a través de su fosforilación. Las MAPKs son capaces de regular la activación del factor de transcripción denominado activador de la proteína-1 (AP-1) (Plotnikov et al., 2011).

Ruta independiente de MyD88 ó dependiente de TRIF

Esta vía alternativa depende de la activación de algunas proteínas adaptadoras, tales como la proteína adaptadora al dominio TIR de interferón- β (TRIF) y la molécula adaptadora relacionada con TRIF (TRAM) (Hyun et al., 2013).

Estas dos proteínas se dimerizan en un heterodímero TRAM-TRIF que es capaz de activar la vía TRAF6-TAK1-IKK, ya comentada. Alternativamente, TRIF podría formar el homodímero TRIF-TRIF y, a través de la activación de TBK1, regular la expresión del factor 3 de regulación del interferón (IRF3) e interferón 1 β (IFN-1 β). IFN1- β se une a sus receptores de membrana que activan a la proteína transductora de señal y activadora de la transcripción (STAT).

Cuando TLR4 finaliza su acción, es ubiquitinado lo que promueve su degradación. Hasta hace muy poco tiempo se pensaba que el único propósito de la movilización de TLR4 dentro de endosomas era permitir su degradación (Husebye et al., 2006). Sin embargo, algunas investigaciones recientes han revelado que esta internalización de TLR4 se requiere para una señalización completa. Esto se comprobó por Kagan y colaboradores que inhibieron la internalización de TLR4 en macrófagos y vieron que, aunque no había cambios en la ruta de NF- κ B, la fosforilación de IRF3 estaba completamente abolida. Así, se dieron cuenta de que la internalización de TLR4 no servía sólo para reducir la señalización de TLR4, sino que permitía la activación de la vía TRAM-TRIF y la inducción de interferón tipo 1 en los endosomas (Kagan et al., 2008; Tanimura et al., 2008). El descubrimiento de que TLR4 se transloca a los endosomas para activar la ruta del interferón tipo I (IFN) también resolvió el misterio de por qué TLR4 era el único receptor asociado a membrana que podía activar la ruta IRF3.

Otros mecanismos celulares que regulan la sobreactivación de TLR-4 en condiciones patológicas son: la producción de inhibidores endógenos, tales como la ubiquitina ligasa Triad3A que promueve la ubiquitinación y posterior degradación de TLR4 (Chuang and Ulevitch, 2004), o la proteína homóloga a TLR4, RP105, que bloquea la señalización de este receptor a nivel de la membrana celular (Divanovic et al., 2005). Los estudios recientes se centran en otros mecanismos relevantes de regulación, como la modificación post-traducciona l de la señalización mediante la acetilación de residuos de lisina (Hu et al., 2013).

5.2.3. Localización de TLR4 en el SNC

Aunque el SNC ha sido considerado desde hace tiempo un órgano inmuno-privilegiado, este estado inmune está lejos de la realidad. El SNC es capaz de organizar respuestas inmunes innatas contra infecciones o daño celular a través de la activación de TLRs (Bsibsi et al., 2002). De hecho, TLR4 está altamente expresado en las células inmunes residentes del SNC, la microglia (Lehnardt et al., 2003). Además, las neuronas (Tang et al., 2008), la astrogliia (Jou et al., 2006), la oligodendrogliia (Kigerl et al., 2007), células madre y progenitores neurales (Rolls et al., 2007), y el endotelio vascular cerebral también expresan TLR-4, aunque en menor medida (Nagyoszi et al., 2010).

Desde un punto de vista funcional, existe una elevada expresión de TLR4 en áreas cerebrales carentes de BHE, órganos circumventriculares, el plexo coroideo y leptomeninges (Lacroix et al., 1998; Laflamme and Rivest, 2001). Allí, el TLR-4 podría estar monitorizando y orquestando las respuestas inmunes periféricas a nivel del SNC. Además, la señalización neuronal y astrocítica de TLR4 induce la activación endotelial del cerebro y la transmigración de neutrófilos en cultivos de células gliales, neuronales o endoteliales mixtas de ratón incubadas con LPS, lo que indica que actúa como mediador de comunicación entre las células del parénquima cerebral y el endotelio a nivel neurovascular (Leow-Dyke et al., 2012). Asimismo, TLR4 regula la vía de señalización MAPK y Jak1/Stat1 en cultivos de astrocitos purificados de cerebro de ratón tras estimulación con LPS (Gorina et al., 2011). Por lo tanto, neuronas y astrocitos parecen ser capaces de detectar infección periférica o daño endógeno (DAMPs), pudiendo iniciar la inflamación del SNC a través de mecanismos dependientes de TLR4.

En resumen, la activación de TLR4 a nivel del SNC se produce por varios mecanismos: 1) los leucocitos circulantes que expresan TLR4 liberan moléculas inflamatorias capaces de activar áreas específicas del cerebro; 2) la activación directa del TLR4 presente en los órganos cerebrales circumventriculares y otras estructuras, como el plexo coroideo y leptomeninges; 3) la activación directa de TLR4 expresado por células endoteliales y perivasculares que forman la BHE; y 4) la

activación del TLR4 expresado por microglía, astrogliá o neuronas que rodean la microvasculatura cerebral. Todos estos son mecanismos no excluyentes.

5.2.4. Funciones generales fisiopatológicas del receptor TLR4 en el SNC

Se sabe que el receptor TLR4 tiene diferentes papeles en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. Aunque las funciones fisiológicas no están bien exploradas a nivel del SNC, se ha descrito su participación en procesos como la inflamación y la neurogénesis (Rolls et al., 2007). Este estudio demostró que la deficiencia en TLR4 en condiciones fisiológicas provocaba un incremento en la proliferación tanto en la ZSG (zona subgranular) como en la ZSV (zona subventricular), así como un incremento en la diferenciación neuronal. Estas neuronas, sin embargo, no sobrevivían a largo plazo, presentando incapacidad para convertirse en neuronas maduras en un sistema *in vivo*, lo que parece indicar que las señales de supervivencia necesarias para completar el proceso neurogénico son dependientes en parte de TLR4 (Rolls et al., 2007). También se ha visto la participación de los TLRs, incluido TLR4, en otros procesos no inmunes como el metabolismo óseo (Bar-Shavit, 2008) y el desarrollo cerebral (Ma et al., 2007).

A) Señalización de TLR4 y neurotransmisión

Este receptor participa en las vías de neurotransmisión relacionadas con la fisiopatología de las principales enfermedades neurológicas ya que recientemente, se ha demostrado que la activación de TLR4 atenúa la síntesis de GABA y la actividad postsináptica de su receptor en astrocitos espinales de roedores en un mecanismo dependiente de la liberación de IL-1 β (Yan et al., 2015). Por otro lado, algunos autores han planteado la hipótesis de que las consecuencias inflamatorias de la activación de TLR4 glial podrían influir en la neurotransmisión serotoninérgica, inhibiendo la síntesis de serotonina mediante la inducción de la enzima indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO). IDO cataliza la degradación de L-triptófano que produce ácido quinolínico y 3-hidroxi-quinurenina, que puede resultar en excitotoxicidad (O'Connor et al., 2009). Esta hipótesis podría ser relevante en la fisiopatología de la depresión, donde se ha descrito una actividad alterada de la IDO y del metabolismo de la ruta de la quinurenina (Maes et al., 2011; Savitz et al., 2015). Además, en los

últimos años se han desarrollado estudios en los que se relaciona la regulación del sistema mesolímbico de dopamina por TLR4, ya que amplifica las secreciones extracelulares de los niveles de dopamina inducida por opioides en roedores sometidos a un modelo de autoadministración de opioides (Hutchinson, Northcutt et al., 2012). Más aún, la activación de TLR4 con cocaína también produce un aumento en el contenido extracelular de dopamina en el *nucleus accumbens*, así como el estímulo de recompensa y refuerzo de esta droga en roedores (Northcutt et al., 2015). Por último, recientemente se ha sugerido que TLR4 podría ser un regulador negativo del impulso simpático en los modelos inducidos por hipertensión (Dange et al., 2014).

B) TLR4 y neuroinflamación en condiciones patológicas del SNC

Dado que la activación del sistema inmune innato es común a varias patologías del SNC, el TLR4 ha sido implicado en su fisiopatología y la manipulación farmacológica/genética de este receptor ha sido sugerida como objetivo terapéutico. Concretamente, TLR4 juega un papel decisivo en el inicio de la neuroinflamación dependiente de NF- κ B por su activación microglial, lo que lleva a la transcripción de múltiples genes pro-inflamatorios (MAP quinasas, citoquinas, quimioquinas, enzimas proinflamatorias) en patologías tales como lesión cerebral traumática, neurodegeneración inducida por abuso de alcohol, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple y patologías crónicas del dolor (Buchanan et al., 2010; Sauer et al., 2014; Trotta et al., 2014). Del mismo modo, existe una asociación entre TLR4 y la proliferación de células madre neurales en el hipocampo tras una lesión cerebral traumática (TBI) en ratones (Ye et al., 2014). Además, en TBI, la activación de TLR-4 contribuye a la formación de edema cerebral mediante un mecanismo relacionado con HGMB1 (Laird et al., 2014).

5.2.5. TLR4 en el daño agudo por ictus

Aunque la neuroinflamación es común a todas estas patologías mencionadas, cada una tiene características particulares y mecanismos fisiopatológicos que podrían ser afectados o regulados por TLR4. Este es el caso de la isquemia cerebral, en la que nuestro grupo fue pionero en descubrir la implicación

de este receptor en el daño cerebral isquémico (Caso et al., 2007). Además, recientemente ha sido implicado en la regulación de la permeabilidad de la barrera hemato-medular (Wang et al., 2014) y en la migración celular y neurogénesis cortical tras isquemia focal (Moraga et al., 2014). Pero no sólo TLR4 está implicado en esta patología, sino que TLR2 también (Hyakkoku et al., 2010). De hecho, hay distintas evidencias experimentales que demuestran que la deficiencia de TLR2 o TLR4 atenúa significativamente el daño cerebral isquémico (Cao et al., 2007; Caso et al., 2007; Tang et al., 2007), incluyendo técnicas innovadoras de neuroimagen (Moraga et al., 2016), y suprime la expresión de citoquinas inflamatorias en células inmunes infiltradas un día después de la isquemia-reperfusión en ratón (Shichita et al., 2012). Concretamente, se ha descrito en los ratones deficientes para TLR4 con daño cerebral una menor expresión de mediadores inflamatorios como IRF-1, iNOS y COX-2, menores niveles de IFN- β , así como expresión reducida de las metaloproteinasas de matriz 9 (MMP-9) (Caso et al., 2007).

A nivel clínico, también se ha demostrado la relevancia de TLR2 y TLR4 en esta enfermedad (Brea et al., 2011; Urra et al., 2009b; Yang et al., 2008). Se ha observado que una mayor expresión de TLR2 y TLR4 produce más respuesta inflamatoria y se asocia con una peor recuperación funcional, después de que los pacientes sufrieran un ictus.

El hecho de que los TLRs se expresen tanto en células circulantes como en células cerebrales hace difícil comprender los complejos mecanismos inflamatorios de su activación en el cerebro isquémico. También queda por aclarar si el efecto de los TLRs sobre las células cerebrales es neurotóxico o neuroprotector. Las células cerebrales, que se activan por daño isquémico, también contribuyen a la inflamación post-isquémica produciendo mediadores inflamatorios como TNF- α , óxido nítrico (NO) y MMPs que regulan la permeabilidad cerebrovascular y aumentan el edema cerebral (Takano et al., 2009). La activación de TLR4 ha sido implicada en la excitotoxicidad inducida por glutamato después de la sobreactivación del receptor NMDA tras ictus (Qiu et al., 2008). Otros autores sugieren que parte de los efectos deletéreos producidos por la activación de TLR4 tras ictus podrían ser debidos a la alteración de la ruta de las quinureninas,

concretamente, a cambios en los niveles/actividad de la enzima triptófano-2,3-dioxigenasa (TDO) (Cuartero et al., 2016).

Pero TLR4 también está implicado en procesos de neuroprotección ya que se ha demostrado su participación en el **precondicionamiento isquémico (PCI)** (Garcia-Bonilla et al., 2014; Konstantinov et al., 2004; Pradillo et al., 2009). La señalización de TLR4 activa NF- κ B, que conduce a la expresión de TNF, iNOS y COX-2, requerido para evocar un efecto de preconditionamiento. Este fenómeno se produce cuando cortos eventos isquémicos disminuyen el daño neuronal al darse una lesión isquémica posterior (Pradillo et al., 2009). Además, la microglía que se activa a través de la ruta de señalización de TLR4 produce factores neurotróficos para la reparación tisular (Lai and Todd, 2006).

No se conoce bien el papel de la expresión periférica de TLR4 ni de TLR2 en el ictus, pero estudios recientes en modelos de isquemia cardiaca en los que se usó médula ósea de ratones quiméricos mostraron que cuando los ratones que expresaban de forma normal TLR2 se trasplantaban con médula ósea de ratones deficientes para TLR2 se observaba mayor protección en el daño por isquemia y por perfusión cardiaca, indicando así una contribución periférica muy elevada (Arslan et al., 2010). Más aún, en otro estudio en el que se trasplantaba la médula ósea entre animales que expresan TLR4 y deficientes de TLR4 se observó que los animales que expresan TLR4 que recibían médula de los deficientes en TLR4 presentaban una reducción significativa del edema y del tamaño del infarto cerebral, mostrando de nuevo, en este caso, una elevada contribución periférica en la génesis del daño isquémico (Yang et al., 2011).

5.3. LA INMUNIDAD ADQUIRIDA EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

La respuesta de la inmunidad adquirida representa un salto evolutivo que confiere un mecanismo de defensa mucho más eficaz contra infecciones y daño celular que la propia inmunidad innata. La respuesta adquirida es más tardía, requiere un periodo de tiempo, necesita de la participación de los linfocitos y tiene “memoria” de procesos previos. En la isquemia cerebral, este tema es objeto de un amplio debate (Miró-Mur et al., 2016).

La respuesta adquirida se inicia cuando los DAMPs preparan a las células dendríticas (CD) para reconocer los antígenos. Se sabe que las CD son una clase especial de células presentadoras de antígenos (APCs) que constituyen el nexo de unión entre la inmunidad innata y la adquirida. Estas se acumulan en el parénquima cerebral durante los días que siguen a la enfermedad cerebrovascular experimental (Felger et al., 2010; Kostulas et al., 2002; Ludewig et al., 2016; Pösel et al., 2014; Reichmann et al., 2002). Además, estas células expresan el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II y moléculas coestimuladoras, así como marcadores de CDs convencionales. La presencia de células que expresan MHC de clase II en el cerebro también se ha descrito en el ictus humano (Schwab et al., 2001). No se conoce cuál es la función exacta de estas células, pero se sabe que ponen en marcha el reconocimiento de los antígenos cerebrales (como la proteína básica de mielina –MBP– y péptidos relacionados) por parte de los linfocitos T. A su vez los linfocitos B producen anticuerpos frente a dichos antígenos. Esta respuesta adquirida tiene el potencial de inducir fenómenos de autoinmunidad frente a antígenos propios; sin embargo, no está claro si los procesos de autoinmunidad son deletéreos o beneficiosos (Chamorro et al., 2012; Iadecola and Anrather, 2011; Ortega et al., 2015). Podrían ser deletéreos ya que, tras el reconocimiento de los antígenos por parte de los linfocitos T infiltrantes, éstos responden proliferando y diferenciándose a células efectoras con propiedades citotóxicas y citoprotectoras. Los linfocitos T y las células $\gamma\delta$ T, a través de la producción de IFN- γ e IL-17 respectivamente, tienen una función crucial en los procesos inflamatorios que potencian el daño, como se demuestra por el hecho de que los animales deficientes en linfocitos T presentan menor daño isquémico (Hurn et al., 2007; Yilmaz et al., 2006).

De forma contraria, los procesos autoinmunes pueden ser beneficiosos ya que las células T autoinmunes y otra subpoblación de linfocitos T, los T reguladores (Treg) son citoprotectores y promueven la reparación tisular (Becker, 2009; Moalem et al., 1999). Así por ejemplo, la inducción de tolerancia inmunológica por aplicación de antígenos cerebrales previo a la isquemia produce un menor infarto cerebral y promueve la reparación (Becker, 2009); las propias neuronas, los astrocitos y la

microglía, mediante la producción de TGF- β , promueven el desarrollo de linfocitos Treg que secretan citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y TGF- β y que son protectoras; de hecho, las células Treg son protectoras en modelos de isquemia experimental (Liesz et al., 2009), aunque no en todos los estudios se observan resultados a nivel neurológico (Stubbe et al., 2013).

JUTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN

El ictus es una enfermedad devastadora que se posiciona como la segunda causa de muerte en el mundo, la segunda causa de demencia, y la principal causa de discapacidad grave entre los adultos a largo plazo. Aunque se ha llevado a cabo una gran inversión en la búsqueda de fármacos neuroprotectores, la traslación de terapias efectivas a nivel experimental ha fracasado en la clínica. De hecho, el único tratamiento aprobado es la recanalización del vaso ocluido por medio de la administración intravenosa de rt-PA, sin embargo, debido a los criterios de inclusión, muy pocos pacientes pueden beneficiarse de este tratamiento. Por lo tanto, su uso es muy restringido por temor a su principal efecto secundario, la TH. Si bien este fenómeno forma parte de la evolución natural del ictus, la administración de t-PA puede exacerbarlo, produciendo hemorragias extensas que comprometan la vida del paciente, por este motivo, muchos estudios actuales se centran en mejorar la terapia trombolítica con el fin de extender su uso. El objetivo es claro: disminuir la TH. En este contexto, hay varias líneas de evidencia que sugieren que TLR4 es una diana terapéutica de interés clínico en el ictus. Por todo ello, en una primera fase de este trabajo se abordó el estudio del receptor TLR4 en el proceso de TH.

Por otro lado, TLR4 y, por tanto, la inmunidad innata están implicadas en el daño cerebral agudo y en la respuesta inflamatoria producida por una isquemia cerebral. Datos experimentales y clínicos sugieren que la expresión de este receptor presenta un papel fundamental a nivel periférico en esta patología pero se desconoce de qué manera participa en la infiltración de leucocitos y como afecta a la polarización de estas células.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Por todo lo expuesto anteriormente, nos planteamos por un lado si la activación del receptor TLR4 participa en el desarrollo de la transformación hemorrágica asociada a la administración tardía de t-PA. Y por otro lado, nos preguntamos qué papel juega este receptor a nivel periférico y si afecta en la infiltración y el fenotipo de alguna de las poblaciones leucocitarias tras ictus experimental.

Para comprobar esta hipótesis diseñamos los siguientes objetivos:

2.2.1. Estudio del efecto del receptor TLR4 en el fenómeno de TH.

- 1) Porcentajes de supervivencia y éxito en el modelo tromboembólico *in situ*.
- 2) Efecto de TLR4 y de la reperfusión sobre el volumen de infarto.
- 3) Efecto de TLR4 y de la reperfusión en la transformación hemorrágica.
- 4) Efecto de TLR4 en el daño a la BHE, en la infiltración de leucocitos y en la expresión de MMP9 tras la administración tardía de t-PA (3h).

2.2.2. Estudio del efecto del receptor TLR4 en la infiltración aguda tras ictus.

- 1) Efecto de TLR4 en la infiltración celular:
 - Infiltración de MDMs Ly6C^{hi}
 - Infiltración de neutrófilos
 - La microglía residente
- 2) Efecto de TLR4 en la respuesta circulante periférica:
 - Monocitos circulantes
 - Neutrófilos circulantes
 - Linfocitos circulantes
- 3) Efecto de TLR4 en la movilización de células de la médula ósea tras isquemia:
 - Monocitos de la médula ósea
 - Neutrófilos de la médula ósea

- Linfocitos de la médula ósea

- 4) Efecto de TLR4 en la infiltración de neutrófilos.
- 5) Efecto de TLR4 en el volumen de infarto tras la eliminación de neutrófilos.
- 6) Efecto del receptor TLR4 en el fenotipo de neutrófilos tras isquemia.
- 7) Efecto del receptor TLR4 de plaquetas y células mieloides en el volumen de infarto tras isquemia.
- 8) Caracterización de los neutrófilos N2 en isquemia experimental.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se realizaron dos bloques de experimentos, dirigidos al estudio de: 1) **El efecto del receptor TLR4 en el fenómeno de TH en un modelo de transformación hemorrágica** y 2) **El efecto del receptor TLR4 en la infiltración aguda tras ictus experimental**.

El protocolo y los experimentos realizados en cada uno de ellos se detallan a continuación.

1. TÉCNICAS IN VIVO

1.1. ANIMALES

Se utilizaron ratones macho C57BL/10ScNJ que no expresan TLR4 ($TLR4^{-/-}$) por una delección espontánea completa del gen de *Tlr4* en esta cepa de ratón; y ratones macho C57BL/10J que no presentan la mutación y que por tanto se consideran como grupo control ($TLR4^{+/+}$). Los animales fueron de 2-3 meses de edad y procedían de Jackson Labs (Bar Harbor, Me. EE.UU.). Se generó un fondo mixto mediante el cruce de ambas cepas (C57BL/10ScNJ y C57BL/10J). Los ratones heterocigóticos resultantes de este cruce se utilizaron para obtener ambos híbridos F2 $TLR4^{-/-}$ y sus hermanos controles $TLR4^{+/+}$.

Los ratones $TLR4^{loxP/loxP}$ se consiguieron gracias a la colaboración con los profesores Timothy R. Billiar y Matthew D. Neal de la Universidad de Pittsburgh (EE.UU.) (Sodhi et al., 2012). Por otro lado se obtuvieron ratones transgénicos que expresan Cre recombinasa bajo el promotor del factor plaquetario 4 (ratón Pf4-cre) o de lisozima (ratón Lys-cre) de Jackson Labs (Bar Harbor, Me. EE.UU.). Los ratones $TLR4^{loxP/loxP}$ se cruzaron con ratones Pf4-cre y Lys-cre, generando así la supresión celular específica de TLR4 y creando los dos grupos celulares específicos siguientes con sus controles:

- 1) Control de tipo salvaje (WT) $TLR4^{loxP/loxP}$.
- 2) Control de tipo salvaje (WT) $TLR4^{Pf4-cre}$.
- 3) Control de tipo salvaje (WT) $TLR4^{Lys-cre}$.
- 4) Supresión específica de plaquetas $TLR4^{loxP/Pf4-cre}$.
- 5) Supresión específica de células mieloides (neutrófilos) $TLR4^{loxP/Lys-cre}$.

El genotipo de los ratones se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction) empleando ADN genómico obtenido de la biopsia de la cola. La extracción del ADN genómico se realizó digiriendo un pequeño fragmento de cola en tampón de lisis (100 mM de NaCl, 10 mM de EDTA, 0,5% de SDS y 10 mM Tris pH8) con proteinasa K (0,1 mg/ml) (Sigma Aldrich, EE.UU..) durante 16h a 55°C, seguido de una extracción con fenol/cloroformo/isoamilo (Invitrogen, EE.UU..) y precipitación con etanol y acetato de sodio. Finalmente, el ADN se dejó secar y se resuspendió en 100 µl de tampón TE (10 mM de EDTA y 10 mM Tris pH 8), de los cuales se utilizaron 2 µl (~100 ng de ADN genómico) como molde para la PCR (Tabla 3).

Gen	Cebadores
TLR4	F: 5'- GCA AGT TTC TAT ATG CAT TCT C - 3' R: 5'- CCT CCA TTT CCA ATA GGT AG - 3'
TLR4-loxP	F: 5'- AGGGAGATGTGTGTGAAGAAGCCT - 3' R: 5'- TGACTTTCTCAGTTTGGTCCTGGG - 3'
Pf4-cre	F: 5'- CCA AGT CCT ACT GTT TCT CAC TC - 3' R: 5'- TGC ACA GTC AGC AGG TT - 3'
Lyz-cre	F: 5'- TTACTGACCGTACACCAAATTTGCCTGC - 3' R: 5'- CCTGGCAGCGATCGCTATTTTCCATGAGTG - 3'
Control interno	F: 5'- CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT - 3' R: 5'- GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C - 3'

Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados para el genotipado de las diferentes colonias de ratones.

Todos los protocolos experimentales se rigieron por las directrices del Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid (directivas de la UE 86/609/CEE y 2003/65/CE). Los ratones se mantuvieron bajo condiciones estándar de temperatura y humedad y ciclos de luz y oscuridad de 12 horas con acceso libre a comida y agua.

1.2. MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA FOCAL PERMANENTE MEDIANTE LIGADURA DE LA ARTERIA CEREBRAL MEDIA

Las cirugías se realizaron bajo anestesia compuesta por 2% de isoflurano en una mezcla de O₂ y aire comprimido (0.2/0.8 L/min). Durante la cirugía, la temperatura corporal se controló con una sonda de temperatura rectal, y se

mantuvo a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ EE.UU.ndo una manta térmica sobre la cual se coloca al animal. El procedimiento quirúrgico fue una variante del descrito por Chen (Chen et al., 1986). Brevemente, se hace una incisión en la línea media entre el lateral del ojo izquierdo y el canal auditivo externo para exponer y retraer el músculo temporal. Tras una pequeña craneotomía (2 mm), se expone la arteria cerebral media (ACM) izquierda sobre la fisura rinal y se liga de forma permanente (MCAO) con una sutura de 9/0 (Nylon, S&T). Las oclusiones se realizaron por debajo de la bifurcación proximal (a lo que llamaremos oclusión proximal) o en la rama distal posterior (a lo que llamaremos oclusión distal), según el caso (Figura 12). La interrupción del flujo sanguíneo se confirmó bajo el microscopio quirúrgico (WILD M650). Los ratones en los que se expuso la ACM pero no se ocluyó se utilizaron como controles sham. Después de la cirugía, los ratones fueron devueltos a sus jaulas con libre acceso a comida y agua.

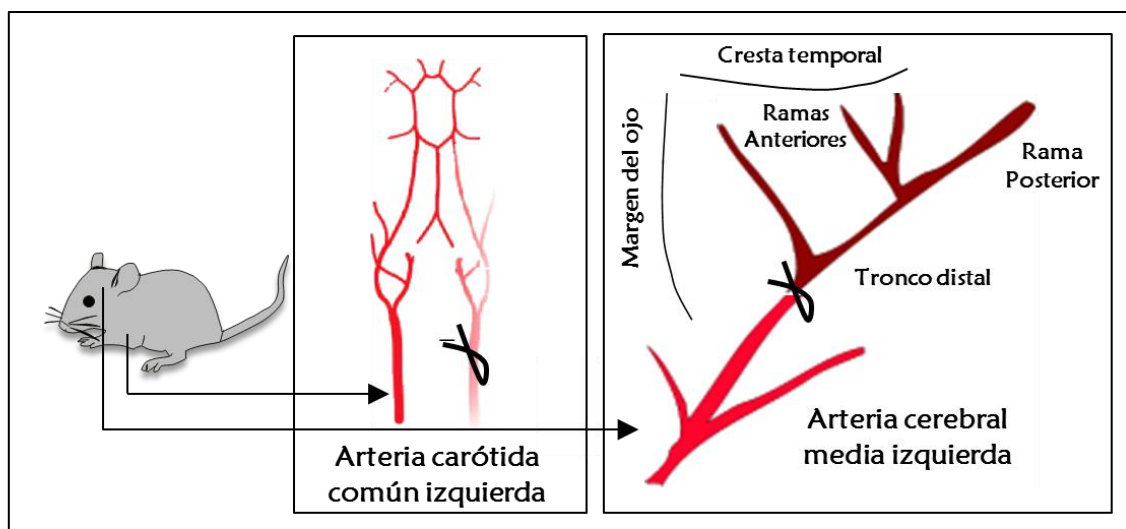


Figura 12. Modelo de oclusión permanente mediante ligadura de la arteria cerebral media en ratón (MCAO). Estructura de la carótida y la arteria cerebral en su región proximal y distal.

1.3. MODELO TROMBOEMBÓLICO IN SITU

El modelo tromboembólico *in situ* (Orset et al., 2007) consiste en la inyección de trombina en la ACM para producir un trombo y así ocluir la arteria. La recanalización se produce administrando t-PA por vía intravenosa, que disuelve el coágulo.

A) ELABORACIÓN DE LAS MICROPIPETAS: La inyección de trombina se realizó con micropipetas elaboradas con ayuda de un *puller* vertical (Pp-83 o PC-10, Narishige, Japón) a partir de capilares graduados (15 mm/ μ l) (Ref 555/5, AssistantGermany, Alemania). La punta se cortó a un tamaño aproximado de unos 50 μ m de diámetro, lo suficientemente pequeño para poder entrar en la arteria sin dañarla en exceso y lo suficientemente grande para evitar la coagulación en la punta durante la inyección.

Para cargar la trombina (α -trombina de ratón, Sigma-Aldrich, EE.UU., Gentaur, Bélgica o Molecular Innovations, EE.UU.), la micropipeta se colocó en un estereotáxico (Davis Kopfs Instruments, EE.UU.) tras lo cual se acopló a un sistema neumático consistente en una jeringa conectada a un tubo de silicona. A continuación, se bajó la punta hasta la trombina y se ejerció presión negativa (succión) para cargarla, conservándose a -20°C hasta su uso.

B) PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO: Para anestesiarse a los animales se empleó isoflurano (IsoVet, PiramalHealthcare, Reino Unido) al 2,5% en la inducción y 1-2% para el mantenimiento, en una atmósfera de N₂O/O₂ al 80%/20% respectivamente. Los animales se colocaron en un estereotáxico para impedir cualquier movimiento durante la inyección, y se reguló su temperatura en torno a los 37°C con una manta térmica provista de una sonda rectal (HB 101/2, Harvard Apparatus, EE.UU.).

Para localizar la ACM se realizó una incisión en la piel entre la oreja y el oído derechos, desde la sutura sagital hasta el arco zigomático, quedando expuesto el músculo temporal. A continuación, se practicó una incisión longitudinal en la inserción de dicho músculo a lo largo de la sutura temporo-parietal y se retrajo el músculo para exponer el hueso temporal. Con ayuda de una lupa binocular (PZMIV, World Precision Instruments, EE.UU.) se identificó la ACM por transparencia, se practicó un trépano (Harvard Apparatus, EE.UU.) de 2-3 mm de diámetro allí donde se visualizaba la bifurcación de las ramas rostral y caudal y, finalmente, se retiraron las meninges. El trépano se protegió con algodón húmedo hasta la inyección de la trombina.

Para comprobar y medir la oclusión y/o reperusión arterial se colocó una sonda láser-doppler (418-1, Perimed AB, Suecia) en territorios más distales a los ocluidos. Para tal fin, se realizó un segundo trépano mucho más pequeño que el

primero, esta vez en el hueso parietal y sobre la rama caudal de la MCA. El flujo medido previo a la oclusión se consideró el 100% (PeriFluxSystem 5000, Perimed AB, Suecia).

Finalmente, se volvió a colocar la pipeta cargada en el estereotáxico. Bajando lentamente y de forma paralela al tronco común de la MCA, se introdujo su punta en el lumen del vaso (Figura 13) y, aplicando presión positiva en el sistema, se inyectó a contraflujo 1 μ l de trombina. Para permitir la estabilización del coágulo, la pipeta se retiró a los 10 min de la oclusión. Se consideró oclusión estable cuando se producía una caída brusca y mantenida del flujo sanguíneo cerebral medido en el registro del láser doppler ($<30\%$) acompañada de un cambio de color del vaso (Figura 13). La recuperación total o parcial del flujo en cualquier rama de la arteria se consideró reperusión espontánea.

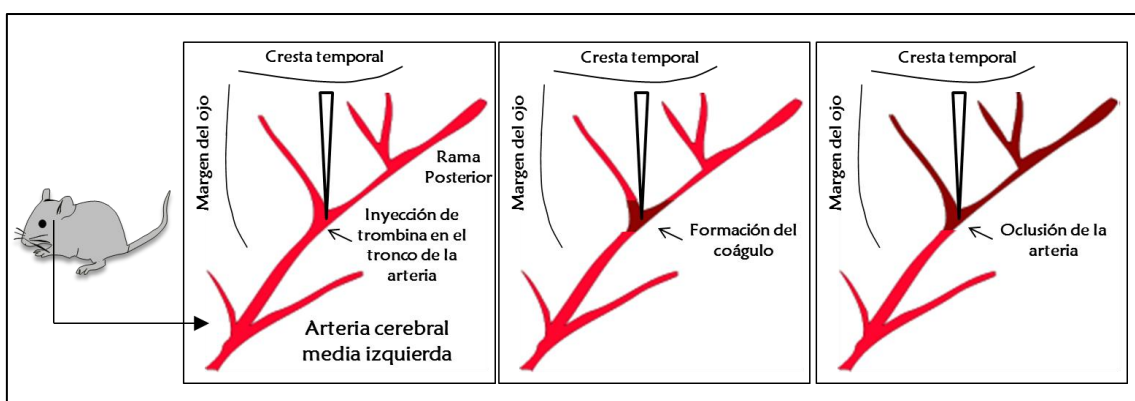


Figura 13. Modelo tromboembólico *in situ* de oclusión permanente de la arteria cerebral media en ratón. Esquema de la ACM. La micropipeta se introduce en la bifurcación de la arteria en sus ramas parietal y rostral, ocluyéndose el tronco común al inyectar trombina.

La oclusión de la ACM, tanto en un modelo como en el otro, genera infartos de tipo cortical que afectan principalmente a la corteza somatosensorial (Figura 14).

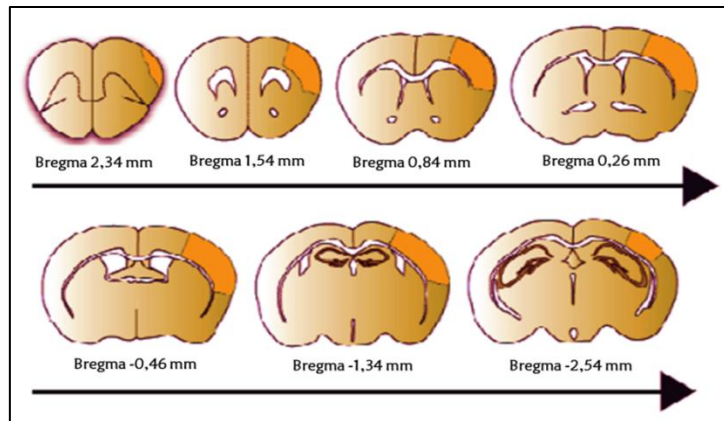


Figura 14. Lesión representativa (naranja), desde su parte anterior a posterior producida por la oclusión de la ACM en su región distal, que afecta de manera mayoritaria a la corteza somatosensorial (Ver (Francklin and Paxinos, 2007)).

Con el fin de administrar t-PA (Actilyse, BoehringerIngelheim, Alemania) o salino, se disecó y canuló la vena caudal en la base de la cola. Con ayuda de una bomba (PhD 2000, Harvard Apparatus, EE.UU.) se administró el tratamiento (10% bolo, 90% infusión durante 40 min). Se consideró una reperusión efectiva del vaso cuando se producía una recuperación estable del flujo sanguíneo superior al 50% del flujo basal así como una recuperación del color en todas las ramas arteriales (Figura 15).

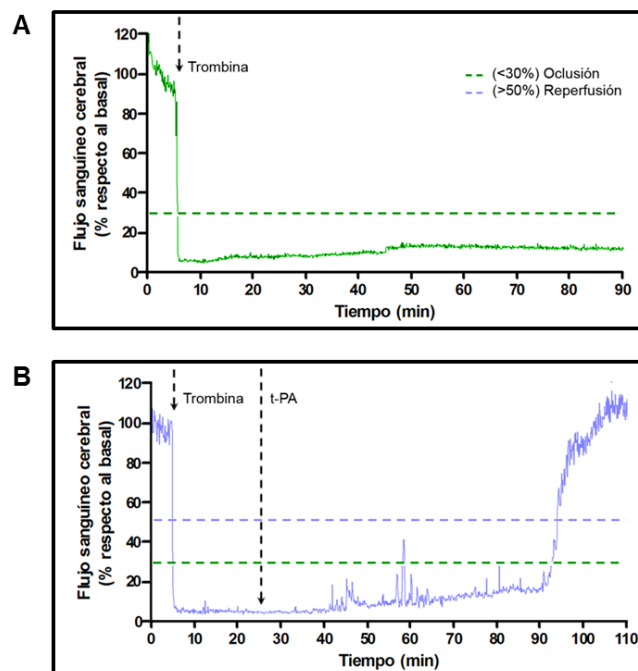


Figura 15. Registro Láser-Doppler representativo. A. Isquemia permanente del grupo MCAO, con caída del registro por debajo del 30% del nivel basal. **B.** Isquemia transitoria del grupo t-PA 20 min, con una recuperación del flujo superior al 50% respecto al basal.

1.4. EXTRACCIONES SANGUÍNEAS Y MEDIDA DE LOS PARÁMETROS SANGUÍNEOS

Con el fin de elaborar un perfil temporal de determinadas células de la sangre, se realizaron tomas sanguíneas de 50µl haciendo una pequeña incisión en la cola del animal a diferentes tiempos tras la isquemia para comparar con la condición basal y la extracción de plasmas.

Por otro lado, con el objeto de asegurar que las diferencias halladas entre los distintos grupos experimentales en el modelo de TH se deben exclusivamente al tratamiento y/o genotipo de los animales, es necesario medir los parámetros sanguíneos y comprobar así que se encuentran dentro de los valores normales y que no difieren entre los distintos grupos. Para tal fin, se eligieron los siguientes parámetros arteriales: presión arterial media (PAM), pH, presión parcial de CO₂ y O₂ (pCO₂ y pO₂), hematocrito y hemoglobina, y se monitorizó la temperatura. Para ello, a un conjunto de animales, independiente del resto de experimentos, se les sometió al protocolo quirúrgico del modelo tromboembólico *in situ* y de ligadura. Previamente a la oclusión de la MCA, se canuló la arteria femoral izquierda y se monitorizó la presión arterial durante al menos 2 min con el sistema Lab-Trax-4/24T (WorldPrecision Instruments, EE.UU.). A continuación se extrajeron 100 µl de sangre de la misma arteria y se analizaron el resto de parámetros indicados con el sistema i-STAT y el cartucho CG8+ (Abbott, EE.UU.). El análisis de la PAM y del resto de parámetros sanguíneos se repitió tras la oclusión de la MCA y tras su reperusión mediante t-PA. El volumen de sangre extraído se repuso con salino estéril después de cada toma.

1.5. ELIMINACIÓN DE NEUTRÓFILOS

La eliminación de neutrófilos se llevó a cabo mediante inyecciones intraperitoneales de un anticuerpo anti-mouse Ly6G (clon 1A8) (BioXcell, UK.) a una dosis de 50 µg/dosis con el protocolo experimental explicado en el apartado anterior.

Para comprobar que el anticuerpo eliminaba los neutrófilos se realizaron tomas de sangre basal y tras tratamiento en cada animal, analizando mediante citometría de flujo la población de neutrófilos mediante los marcadores Gr-1 y CD11b (Figura 16).

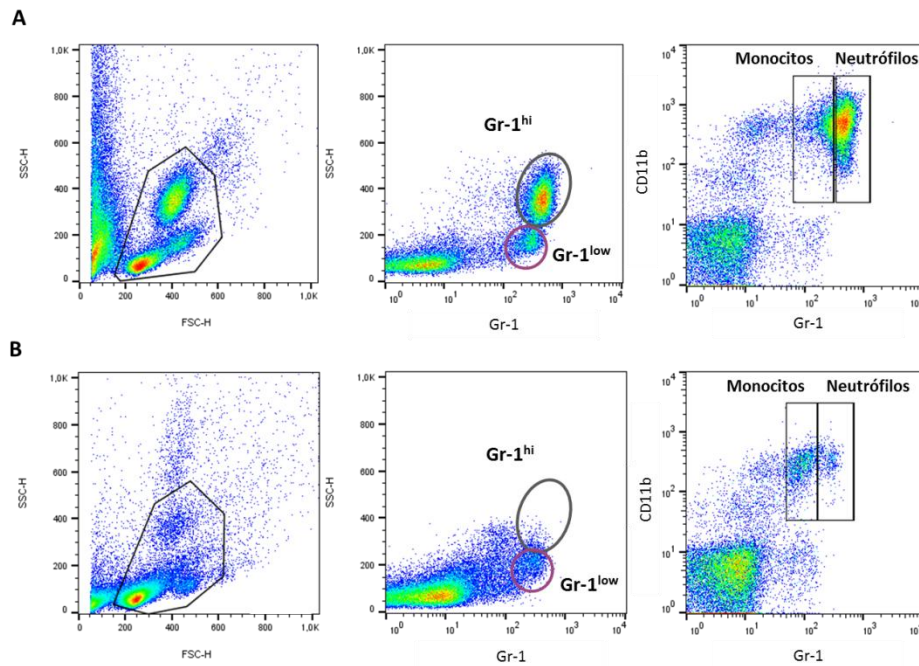


Figura 16. Eliminación de neutrófilos. A. Condición basal de muestra de sangre. **B.** Muestra de sangre con tratamiento de anticuerpo anti-Ly6G. Todas las muestras se marcaron con los anticuerpos Gr-1 y CD11b y se analizaron con el Software FlowJo. Se considera población de neutrófilos CD11b⁺ Gr-1^{hi}.

1.6. EVALUACIÓN DE LOS DÉFICITS NEUROLÓGICOS

La isquemia cerebral produce unos signos neurológicos que varían según la zona infartada y, por lo tanto, cuanto mayor es el daño, mayores son los déficits. Con el fin de evaluarlos, se empleó el siguiente test:

Test de la huella (*Foot print test*)

La evaluación de alteraciones motoras se llevó a cabo mediante la determinación de la longitud del paso, metodología comúnmente utilizada para evaluar las alteraciones motoras en roedores en la enfermedad de Huntington (Carter et al., 1999) y, recientemente, en el ictus (Hernández-Jiménez et al., 2017). Con este objetivo, las patas traseras se pintaron con pintura no tóxica. Posteriormente, se colocó al animal en un pasillo de 50 cm de largo, 10 cm de ancho y 10 cm de altura. Todos los animales realizaron tres entrenamientos previos a la medida basal. Se midió la longitud de la zancada trasera representada como la distancia promedio entre cada zancada, así como la distancia entre las patas

traseras derecha e izquierda (Figura 17). Fueron excluidos los 2 primeros y últimos pasos de cada animal (Carter et al., 1999).

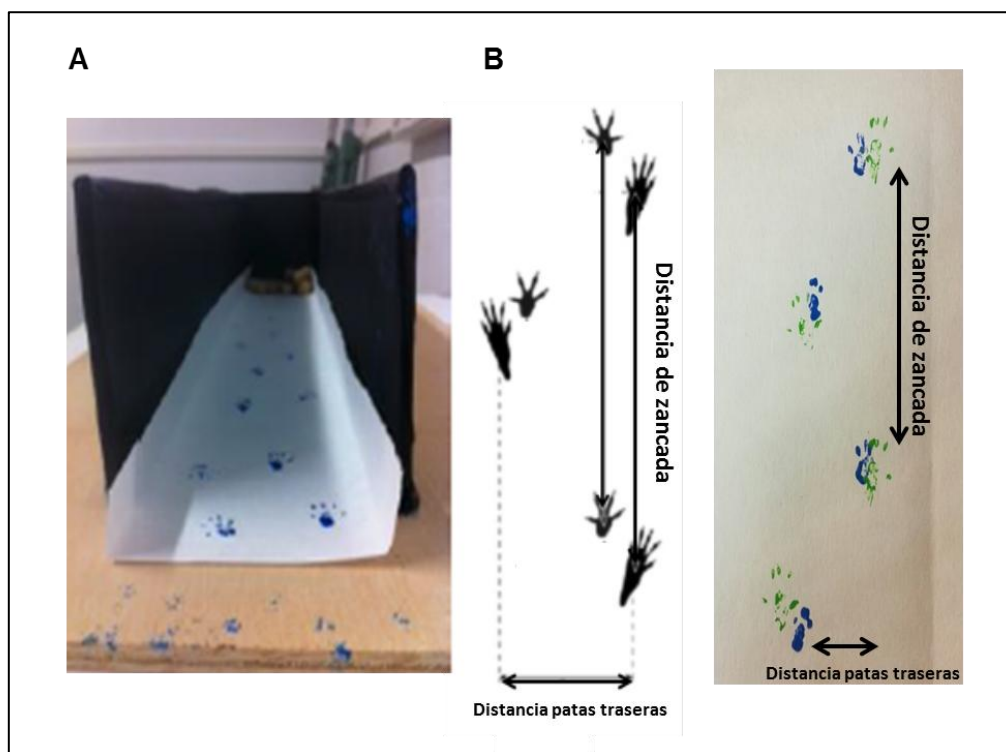


Figura 17. Test de la huella. A. Imagen que muestra cómo se realiza el test. B. Imágenes representativas del esquema y muestra real de los patrones del test de la huella.

2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES Y DETERMINACIONES

2.1. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

2.1.1. Preparación del tejido para estudios histológicos y de inmunofluorescencia

Se sacrificaron los animales, tras lo cual se reperfundieron con tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 a un flujo de 5 ml/min durante 5 min. A continuación, se pasaron unos 80 ml de paraformaldehído (PFA) frío y al 4% en PB 0,1 M pH 7,4 al mismo flujo durante 5 min. Tras extraer el cerebro, éste se mantuvo durante la noche a 4°C en PFA, seguido de 2 días en sacarosa 30% en PB 0,1 M; por último, se congeló en isopentano y se mantuvo a -80°C hasta su uso.

- Para las muestras del estudio de TH: con ayuda de un criostato (JUNG CM1800, Leica, EE.UU.) se cortaron secciones de 15 y 30 µm de grosor.

- Para las muestras del estudio de la infiltración, se llevaron a cabo las histologías por inmunofluorescencia, para lo que se cortaron secciones coronales de cerebro de 40 µm de grosor con la ayuda de un microtomo de congelación (Leica, Alemania.).

Para realizar los ensayos de **inmunofluorescencia**, se tomaron secciones equidistantes desde el comienzo de los ventrículos laterales (1,70mm de bregma, según “The mouse brain stereotaxic coordinates” (Paxinos and Franklin, 2001), separadas a distancias concretas en función del ensayo. Una vez elegidas las secciones a utilizar para la tinción por inmunofluorescencia, se lavaron 3 veces en PBS y posteriormente se incubaron con los distintos anticuerpos primarios (Tabla 4) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las secciones se lavaron 3 veces en 0,25% Triton-PBS tras lo cual se incubaron con sus respectivos anticuerpos secundarios durante dos horas a temperatura ambiente y oscuridad. Cuando se finalizó la tinción, las secciones realizadas con el microtomo se montaron en portas y se codificaron para la cuantificación.

Epítipo	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Anticuerpo terciario	Suero de bloqueo
IgG	Anti IgG biotinilado hecho en cabra (Vector Lab) 1:500	-----	Alexa 488 Streptavidina (Invitrogen) 1:500	Suero de cabra (Jackson)
MMP-9	Anti MMP-9 hecho en cabra (R&D Systems) 1:200	Anti cabra biotinilado (caballo) (Vector Lab.) 1:400	Alexa 488 Streptavidina (Invitrogen) 1:500	Suero de caballo (Jackson)
GLUT-1	Anti GLUT-1 hecho en conejo (Millipore) 1:200	Anti conejo Cy3 ó alexa 647 (burro) (Vector Lab.) 1:500	-----	Suero de burro (Jackson)
NIMP-R14	Anti NIMP-R14 hecho en rata (ABCAM) 1:250	Anti rata Cy3 (burro) (Vector Lab.) 1:500	-----	Suero de burro (Jackson)
YM1	Anti YM1 hecho en conejo (Stem Cell) 1:200	Anti conejo biotinilado (cabra) (Vector Lab.) 1:400	Alexa 488 Streptavidina (Invitrogen) 1:500	Suero de cabra (Jackson)
TLR4	Anti TLR4 monoclonal (ABCAM) 1:50	Anti ratón biotinilado (caballo) (Vector Lab.) 1:400	Alexa 488 Streptavidina (Invitrogen) 1:500	Suero de caballo (Jackson)
NeuN	Anti NeuN monoclonal (Millipore) 1:400	Anti ratón alexa 647 (cabra) (Invitrogen) 1:500	-----	Suero de cabra (Jackson)

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en los estudios de inmunofluorescencia.

2.1.2. Preparación del tejido y marcaje de muestras para estudios de citometría de flujo

Muestras de cerebro: los animales se perfundieron con suero salino (0,9 % NaCl) y se aislaron los cerebros para posteriormente diseccionar el tejido isquémico mediante un escalpelo. El tejido diseccionado se colocó en un tubo *falcon* de 50ml con HBS frío y se disgregó. La suspensión de tejido se centrifugó 5 minutos a 400 g tras lo cual resuspendió en una solución enzimática para su completa disgregación (0,05 % colagenasa, 0,025 U/ml de DNAsa y 0,5 % de dispasa) y se mantuvo una hora en agitación a 37°C. Posteriormente la mezcla se transfirió a un disgregador de tejido y se homogenizó con 10 pases hasta transferirse finalmente en un *falcon* de 50ml con 5ml de suero fetal bovino al 10%. Seguidamente se centrifugó 400 g durante 5 minutos y el *pellet* se resuspendió en una solución de Percoll® (Sigma, EE.UU..) al 35 % que, tras centrifugarse durante 45 minutos a 800 g. Finalmente, tras separar la mielina, el *pellet* de células se resuspendió en el tampón FACs.

Muestras de sangre: tanto las muestras extraídas de la cola como las recogidas tras el sacrificio del animal (por punción cardiaca con una jeringa de 25G pre-tratada con una solución de citrato de sodio al 3,8%; aproximadamente 200 µl) se mezclaron con 20 µL de citrato (10%) en un *eppendorf* y se reservaron a 4°C protegidas de la luz hasta el momento del experimento. Posteriormente, se procedió a la lisis de glóbulos rojos añadiendo tampón de lisis (16,6 g de cloruro amónico, 2 g de bicarbonato sódico y 0.074 g de EDTA en 1 litro de agua) durante 6 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron las muestras 5 minutos a 1500 rpm y 4°C y se descartó el sobrenadante por aspiración. Después se hizo un lavado con 4 ml de PBS 1X frío y se centrifugó de nuevo 5 minutos a 1500 rpm y 4°C. Se eliminó el sobrenadante por aspiración y se resuspendió el precipitado en tampón FACS.

Muestras de médula ósea: Para la obtención de células de medula ósea se utilizaron los fémures y las tibias de los ratones, donde se lavó el estroma óseo con FACS buffer (5 ml en total) que se recogió en un *falcon* de 50 ml. El tejido se homogeneizó mediante 5 pases usando una jeringa de mezcla (con punta roma y

gran calibre). Posteriormente se centrifugó la suspensión 400 g 5 minutos y se aspiró el sobrenadante para resuspender posteriormente el *pellet* de células en 1 mL de buffer de lisis (RBC Lysing Buffer. Sigma, EE.UU.), dejándolo actuar 1 min. Finalmente se añadieron 9 ml más de FACS buffer, se centrifugó a 400 g 5 minutos y las células se resuspendieron en FACS buffer.

Tras la preparación de las muestras para los estudios de citometría de flujo, se procedió a realizar la tinción de los marcadores de interés. Para ello, se transfirieron 200 μ L de cada muestra a una placa de 96 pocillos, tras contar por cámara de Neubauer el número de células aisladas a una concentración de 5×10^6 células/ml en el caso de la B.M. y de 1×10^6 células/ml en el caso de cerebro y sangre. Seguidamente se añadió 1 μ L por pocillo de bloqueante del fragmento Fc (FcR Blocking reagent, Miltenyi, España.) y se incubó la placa durante 20-30 minutos en agitación. Tras el bloqueo, se realizó la tinción de cada muestra con la mezcla de anticuerpos de superficie específicos para cada determinación (Tabla 5). Cada anticuerpo se usó a una concentración de 1 μ g/ml. Tras una hora de incubación en agitación con la mezcla de anticuerpos, se añadieron 150 μ L de FACS buffer y se centrifugó la suspensión a 400 g 5 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante por inversión y se resuspendió cada muestra en 200 μ L de FACS buffer.

Las muestras destinadas a la detección del antígeno intracelular YM1 se lavaron con FACS buffer frío, se fijaron con PFA al 4% y se permeabilizaron con PBS-Tween20 0,1%. Las células permeabilizadas se incubaron con rabbit anti mouse YM1 (Stem Cell, Francia.) en FACS buffer durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron con FACS buffer y se incubaron con un anticuerpo secundario IgG anti rabbit conjugado a FITC o PE (Biolegend, UK.) que permite la detección del anticuerpo primario. Finalmente, se realizó un último lavado (1ml), se centrifugaron las muestras (400 g; a 4°C; 5 minutos), se descartó el sobrenadante por inversión y las muestras se resuspendieron en 200 μ L de FACS buffer para proceder a su análisis.

Anticuerpo	Clon	Casa comercial	Anticuerpo secundario
YM1	-----	Stem Cell	Alexa Fluor® 488 anti-conejo IgG
Violeta brillante 510™ anti ratón Ly-6C	HK1.4	Biolegend	-----
APC/Cy7 anti ratón/humano CD11b	M1/70	Biolegend	-----
Pacific Blue™ y APC anti ratón Ly-6G	1A8	Biolegend	-----
FITC anti ratón CD115 (CSF-1R)	AFS98	Biolegend	-----
APC anti ratón CCR2		R&D systems	-----
PE/Cy7 anti ratón CD45	30-F11	Biolegend	-----
PerCP anti ratón Gr1		R&D systems	-----
PE/Cy7 anti ratón/humano B220	RA3-6B2	Biolegend	-----
PerCP/Cy5.5 anti ratón CD3	17A2	Biolegend	-----
7-Amino-actinomycin D (7AAD)	-----	Invitrogen	-----

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para los experimentos de citometría de flujo.

2.1.3. Preparación del tejido para aislamiento de neutrófilos y análisis genómico

Para el aislamiento de neutrófilos en sangre, se sacrificaron 6 animales $TLR4^{+/+}$ y 6 animales $TLR4^{-/-}$ 48 horas tras isquemia. Mediante punción cardiaca, con una jeringa heparinizada (10% heparina) se realizó la extracción de 1 mL de sangre en cada animal y se realizó un “pool” de muestras por grupo experimental. Seguidamente, se procedió con el protocolo de lisis de glóbulos rojos explicado anteriormente, y se realizó un bloqueo del fragmento Fc (FcR Blocking reagent, Miltenyi, España.) durante 20-30 minutos. Posteriormente se llevó a cabo el marcaje de neutrófilos con el anticuerpo de superficie Ly6G durante una hora y, tras un lavado con FACS buffer, se resuspendieron las células para su posterior separación mediante un citómetro sorter FACS Aria III® (Becton Dickinson S.A., EE.UU.) en el servicio de citometría de la Universidad Complutense de Madrid. Se realizaron 3

réplicas por cada condición de las que se separaron 2 millones de células Ly6G positivas (Figura 18).

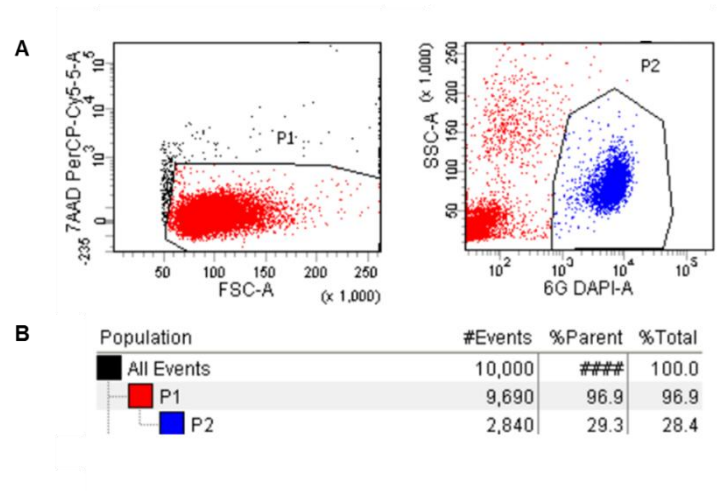


Figura 18. Población de neutrófilos (Ly6G⁺) aislada para los ensayos con microarray. A. Dotplot de la población seleccionada con marcaje Ly6G y marcaje 7AAD para evitar aislamiento de células no viables. **B.** Rendimiento del aislamiento de neutrófilos.

2.1.4. Extracción de ARN

Las células aisladas por sorter se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm. Para la extracción del ARN, el pellet se homogeneizó mecánicamente utilizando 200µl de Nucleozol® (Macherey-Nagel, Alemania.). Una vez homogeneizado, se añadieron 80µl de agua y, tras mezclar por agitación, se centrifugaron las muestras obteniéndose un sobrenadante al que se le añadieron 250µl de isopropanol para la precipitación de ARN durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez precipitado, se lavó con etanol al 75% y se resuspendió en agua libre de RNasa (Invitrogen, EE.UU.). La cantidad de ARN se determinó espectrofotométricamente (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer, EE.UU.) y la pureza se evaluó como el cociente entre los valores de absorbancia a 260nm y 280nm (1,8-2,0).

2.1.5. Análisis de expresión génica global con microarray

Se realizó la hibridación en microarrays del genoma completo de las muestras de neutrófilos aislados de sangre. Estas fueron procesadas con GeneChip® WT PLUS Reagent Kit (Affymetrix®), hibridadas con GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix®) y escaneadas con un GeneChip® Scanner 3000 7G

(Affymetrix®). Los perfiles de expresión génica en las dos condiciones utilizadas para esta técnica y se compararon mediante análisis bioinformático.

2.2. DETERMINACIONES

2.2.1. Cálculo del volumen de infarto

A) POR RESONANCIA MAGNÉTICA: Las resonancias magnéticas se llevaron a cabo a las 24 horas tras la oclusión de la ACM EE.UU.ndo BIOSPEC BMT 47/40 (Bruker, Ettlingen, Germany) con un campo de 4,7 teslas que permite la obtención de imágenes por resonancia magnética *in vivo* y que, junto con el software de imagen ParaVision, permiten la adquisición y reconstrucción de imágenes y el procesamiento de los datos obtenidos. Una vez adquiridas las imágenes, nos servimos del software ImageJ1,33u (NIH, Bethesda, MD, EE.UU..) para determinar los volúmenes de hemisferio infartado en los distintos grupos a partir de las imágenes en T2.

B) TINCIÓN DE NISSL: Para realizar esta técnica es necesario tanto lavar la sangre intravascular (evitando la tinción de peroxidasas endógenas), como fijar con PFA. Se emplearon un total de 21 cortes, separados uno de otro por 400 µm y desde bregma 3,2 mm a bregma -4,8 mm. Las secciones fueron primero hidratadas en PB. Seguidamente, se incubaron 1-2 min en una solución de violeta de cresilo al 0,5% (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y 1,5% de ácido acético. Posteriormente, se deshidrataron en una batería de alcoholes de gradación creciente (70%, 95% y 100%, 30 s en cada uno) y, finalmente, se sumergieron en xileno durante 5 min, tras lo cual se aplicó (o se cubren con) medio de montaje. Finalmente, se colocaron los portaobjetos sobre una plantilla milimetrada y se fotografiaron con una cámara digital. Esta técnica EE.UU. un colorante acidófilo, el violeta de cresilo, para teñir el núcleo, nucleolos y retículo endoplasmático rugoso de las células. Proporciona así una panorámica general de la distribución, tamaño y morfología de las neuronas en el sistema nervioso, lo que permite visualizar claramente el tejido infartado.

C) CUANTIFICACIÓN DE LA ÁREAS: Con un observador “ciego” a las condiciones experimentales, tanto en una técnica como la otra, se calcularon las áreas de tejido infartado (InfArea), el hemisferio ipsilateral entero (IpsArea) y el hemisferio contralateral entero (ContrArea) para cada sección. Después, se calculó el porcentaje de hemisferio infartado (%HI) como ya se hizo previamente (Hernández-Jiménez et al., 2013) (Figura 19) usando la fórmula:

$\%HI = \frac{\text{InfVol}}{\text{ContrVol}} \times 100$ donde InfVol (Volumen de tejido infartado) = $\sum \text{InfArea}_i / \text{Índice de edema}_i$, ContrVol (Volumen de hemisferio contralateral) = $\sum \text{ContrArea}_i$ e Índice de edema_i = $\text{IpsArea}_i / \text{ContrArea}_i$.

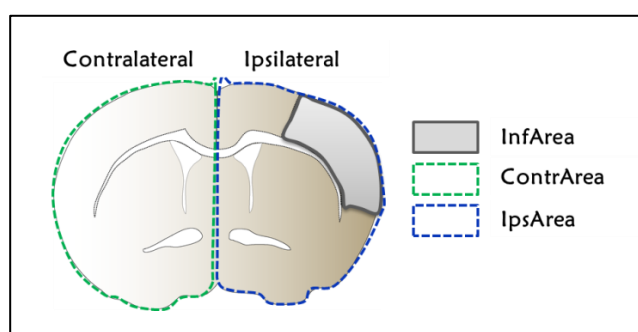


Figura 19. Medidas utilizadas para el cálculo del volumen del infarto expresado como % de hemisferio infartado. La división del área infartada por el índice de edema solo se lleva a cabo si dicho índice es mayor a 1.

Para dichas medidas empleamos 16 secciones separados 391 micras entre sí desde bregma 2,5 mm a bregma -2,7 mm. La conversión de las medidas obtenidas con el MRI analysis calculator a unidades de volumen (mm³) para su introducción en la fórmula de % Hemisferio Infartado se consiguió aplicando las siguientes formulas:

Resolución en el Plano = Vol MRI analysiscalculator x 0,098 x 0,098

Resolución en Volumen = Resolución Plano x 0,391

Volumen Infarto = Suma de volúmenes

2.2.2. Clasificación macroscópica de la hemorragia

Muchos estudios clínicos y algunos experimentales (del Zoppo et al., 1992; von Kummer and Hacke, 1992; Millan et al., 2007; Copin and Gasche, 2008) clasifican la hemorragia en diferentes clases según la magnitud y tipo de sangrado en:

- No hemorragia (NH): caracterizado por la ausencia sangrado evidente.
- Infarto hemorrágico tipo 1 (HI-I): caracterizado por la existencia de sangrados pequeños y aislados, llamados petequias, generalmente a lo largo del borde del infarto.
- Infarto hemorrágico tipo 2 (HI-II): caracterizado por petequias que convergen dentro del área infartada.
- Hemorragia parenquimal tipo 1 (PH-I): caracterizado por la presencia de grandes acúmulos de sangre en menos del 30% del parénquima dañado.
- Hemorragia parenquimal tipo 2 (PH-II): caracterizado por hemorragias que ocupan más del 30% del tejido lesionado.
- Hemorragia remota (rPH): caracterizado por la existencia de sangrado fuera del tejido isquémico.

Cada animal fue clasificado en uno de estos grupos por un investigador ciego al tratamiento, atendiendo al sangrado más extenso que presentaba en los cortes histológicos. Finalmente, se calculó el porcentaje de cada uno de los tipos de sangrado en cada grupo de tratamiento.

2.2.3. Medida del área hemorrágica

Para estimar el área ocupada por la hemorragia se utilizó la tinción de Las peroxidasas endógenas, que se basa en teñir los glóbulos rojos para, a continuación, medir el área que ocupan los extravasados. Sin embargo, requiere eliminar los eritrocitos intravasculares por lo que, durante el sacrificio, los animales se perfundieron con PB. Los glóbulos rojos tienen un alto contenido en peroxidasas, enzimas muy empleadas en técnicas de inmunohistoquímica asociadas a anticuerpos. Al oxidar un sustrato, la diaminobencidina (DAB), dan un color marrón allí donde estén, lo que permite detectar la proteína a la que se unió el anticuerpo. Por ello, en este caso, se omite la inhibición de las peróxidasas endógenas. La incubación directamente con DAB permite la detección de los eritrocitos y la visualización de la TH (Wakisaka et al., 2010).

Para realizar esta tinción se emplearon 21 secciones coronales de 30 μm de grosor, separadas cada una por 400 μm y desde bregma 3,2 mm a bregma -4,8 mm. Tras

una hidratación rápida en PBS, se incubaron durante 20 min con una solución de DAB preparada según las instrucciones del kit (Peroxidase substrate kit, Vector Laboratories, EE.UU.). A continuación, se lavaron de nuevo con PBS, se deshidrataron en una batería de alcoholes de gradación creciente (70%, 95% y 100%, 30 s en cada uno) y, finalmente, se sumergieron en xileno durante 5 min y se cubrieron con medio de montaje.

Para la cuantificación se realizó un método estereológico: la estimación del volumen ocupado por eritrocitos extravasados se llevó a cabo con un microscopio Olympus BX51 (Olympus, EE.UU.), objetivo de 10X y una videocámara DP-70 (Olympus, EE.UU.), empleando el software CastGrid (Visiopharm, Dinamarca). El área de hemorragia se estimó mediante el principio de Cavalieri, basado en el recuento de puntos asociados a un área que se localizan en la estructura a cuantificar, en este caso, las hemorragias.

2.2.4. Cuantificación celular por estereología

Para la cuantificación del número de células NIMPR14⁺ o células Ym1⁺/NIMPR14⁺ infiltradas en el tejido isquémico se usó el método del fraccionador óptico, que permite realizar una estimación del número total de células presentes en una estructura determinada (Gundersen et al., 1988).

Para ello, se obtuvieron cortes seriados de 40µm de grosor tomando una de cada 8 secciones consecutivas y quedando las secciones separadas 320 µm entre sí. Se utilizó un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i Nikon Corporation, Japón.) y el software StereoInvestigator 6 (MicroBrightfield Inc, EE.UU.). La delimitación del área se realizó sobre la zona infartada. Como criterios de medición, se tomaron 6 secciones equidistantes por cada cerebro y se estableció un área de disector óptico de 1600 µm² y un coeficiente de error medio de la estimación de 0.1. Para establecer la densidad de células NIMPR14⁺ o Ym1⁺/NIMPR14⁺ infiltradas, el número total de células cuantificadas se dividió por el volumen del área muestreada obtenido por Cavalieri y los resultados se representaron como número de células positivas por mm³.

2.2.5. Cuantificación de la extravasación de IgG

Esta técnica permite evaluar de forma rápida el estado funcional de la BHE, ya que se extravasa mayor cantidad de IgG plasmática cuanto mayor es su permeabilidad. Para la cuantificación se empleó un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i Nikon Corporation, Japón.), un objetivo de 10X y el software Stereoinvestigator 6 (Micro Brightfield Inc., EE.UU.). La suma del área positiva, medida en ocho secciones en la corteza ipsilateral desde 1,6 de bregma a -2,4 (una cada 400 μm), se estimó utilizando la aplicación del principio de Cavalieri.

2.2.6. Análisis por citometría de flujo

Para la adquisición de datos usamos un citómetro de flujo FACSCalibur® (Becton Dickinson S.A., EE.UU.) y el software BD Cellquest™ PRO (Becton Dickinson S.A., EE.UU.). Los parámetros de adquisición se definieron en función del tamaño y la complejidad celular de las poblaciones analizadas por citometría. El análisis de datos adquiridos en el citómetro FACS Calibur se llevó a cabo empleando el programa FlowJO (TreeStar inc., EE.UU.) y los datos adquiridos en el citómetro FACS Aria III® (Becton Dickinson S.A., EE.UU.) fueron procesados y compensados, si se requería, con el software Summit V4.3. (Dako Colorado Inc., EE.UU.).

A) Análisis de la corteza cerebral ipsilateral

A partir del *dotplot* de tamaño y complejidad de la muestra, delimitamos una región leucocitaria R1 que contenía las diferentes poblaciones celulares de interés (Figura 20).

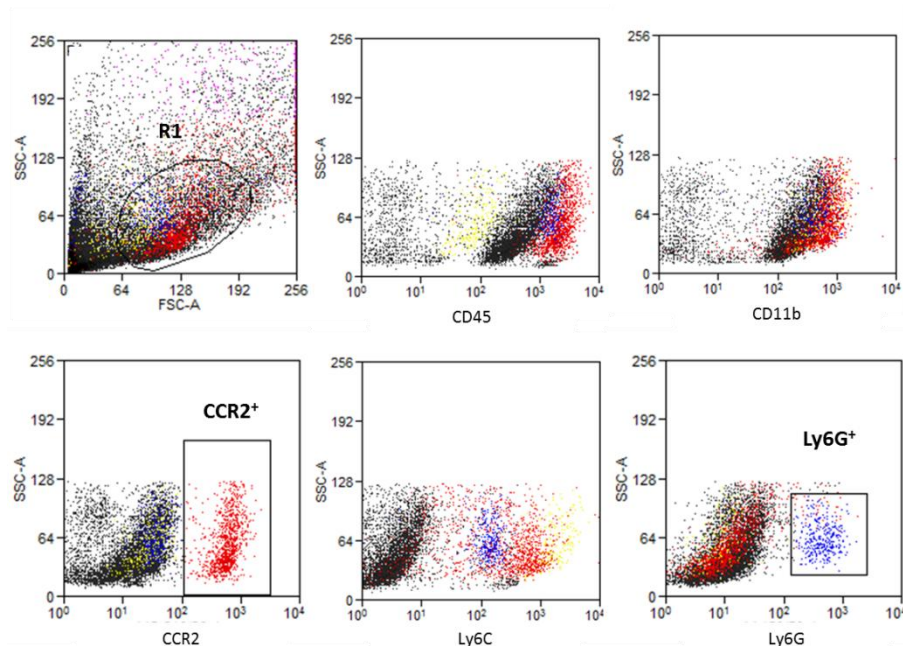


Figura 20. Diagramas de puntos representativos con las regiones que contienen las poblaciones de interés en la corteza cerebral. El diagrama superior de la izquierda muestra la distribución típica de las poblaciones de la corteza cerebral según su tamaño y complejidad (SSC-A y FSC-A, respectivamente). Los siguientes diagramas muestran los marcadores utilizados para caracterizar las poblaciones de interés en el cerebro.

Estas poblaciones de la corteza ipsilateral vendrán definidas por los siguientes marcadores:

- Neutrófilos: $CD11b^+ Ly6G^+$ (Figura 21).

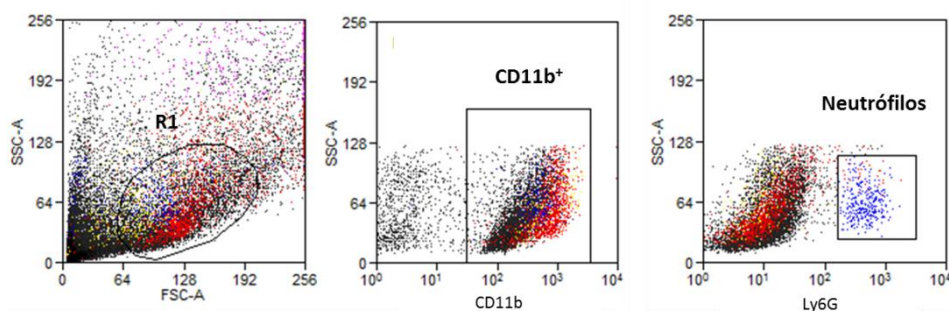


Figura 21. Marcadores utilizados para caracterizar neutrófilos en las muestras de cerebro.

- Microglía: $CD11b^+ Ly6G^- CCR2^- CD45^{low}$ (Figura 22)

- Macrófagos derivados de monocitos (MDM) (Figura 22):

- $CD11b^+ Ly6G^- CCR2^+ Ly6C^{low}$

- $CD11b^+ Ly6G^- CCR2^+ Ly6C^{hi}$

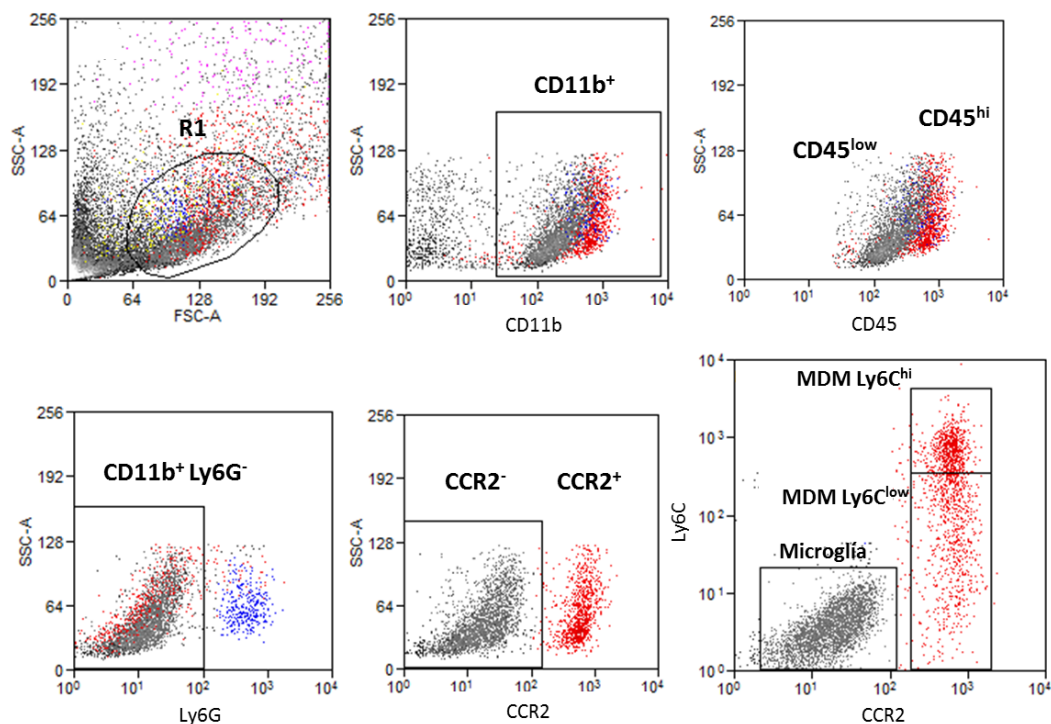


Figura 22. Marcadores utilizados para caracterizar microglía y MDMs en las muestras de cerebro.

B) Análisis de la sangre periférica

Al igual que en el resto de experimentos, una vez seleccionada la región R1 que contiene las poblaciones de interés, se analizaron las diferentes poblaciones y se distribuyeron como se muestra en los *dot plot* (Figura 23).

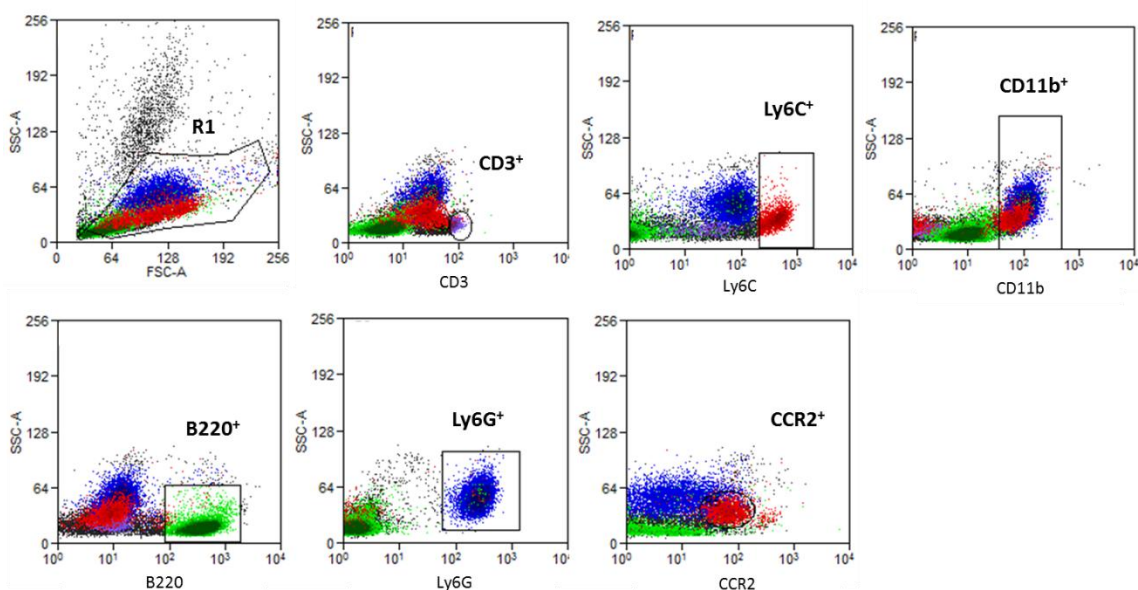


Figura 23. Diagramas de puntos representativos con las regiones que contienen las poblaciones de interés en la sangre. El diagrama superior de la izquierda muestra la

distribución típica de las poblaciones sanguíneas según su tamaño y complejidad (SSC-A y FSC-A, respectivamente).

Estas poblaciones vendrán definidas por los siguientes marcadores:

- Células B: B220⁺ (Figura 24).

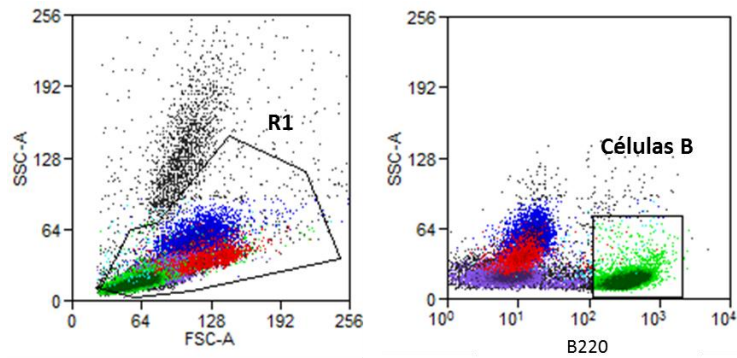


Figura 24. Marcadores utilizados para caracterizar linfocitos B en las muestras de sangre.

- Células T: CD3⁺ B220⁻ (Figura 25).

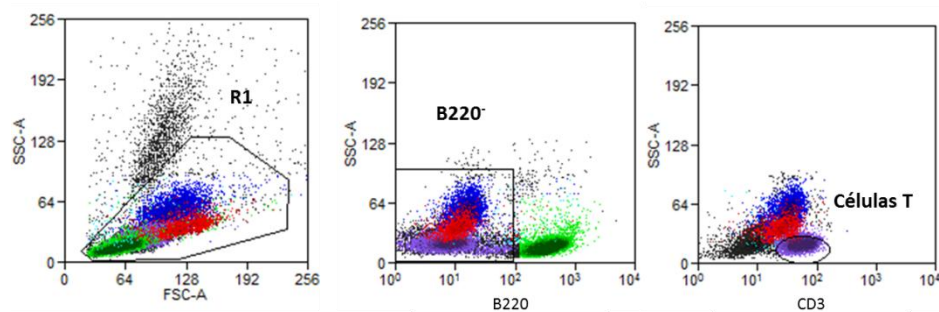


Figura 25. Marcadores utilizados para caracterizar linfocitos T en las muestras de sangre.

- Neutrófilos: CD11b⁺ Ly6G⁺ (Figura 26).

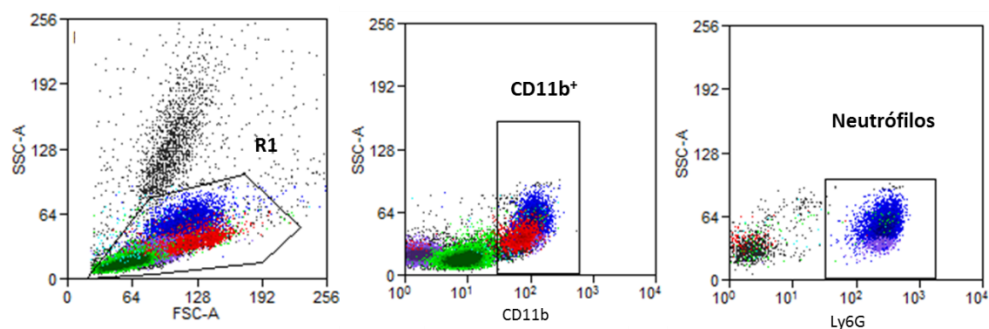


Figura 26. Marcadores utilizados para caracterizar neutrófilos en las muestras de sangre.

- Monocitos (Figura 27):

- B220⁻ CD3⁻ Ly6G⁻ CD11b⁺ CCR2⁺ Ly6C^{lo}

- B220⁻ CD3⁻ Ly6G⁻ CD11b⁺ CCR2⁺ Ly6C^{hi}

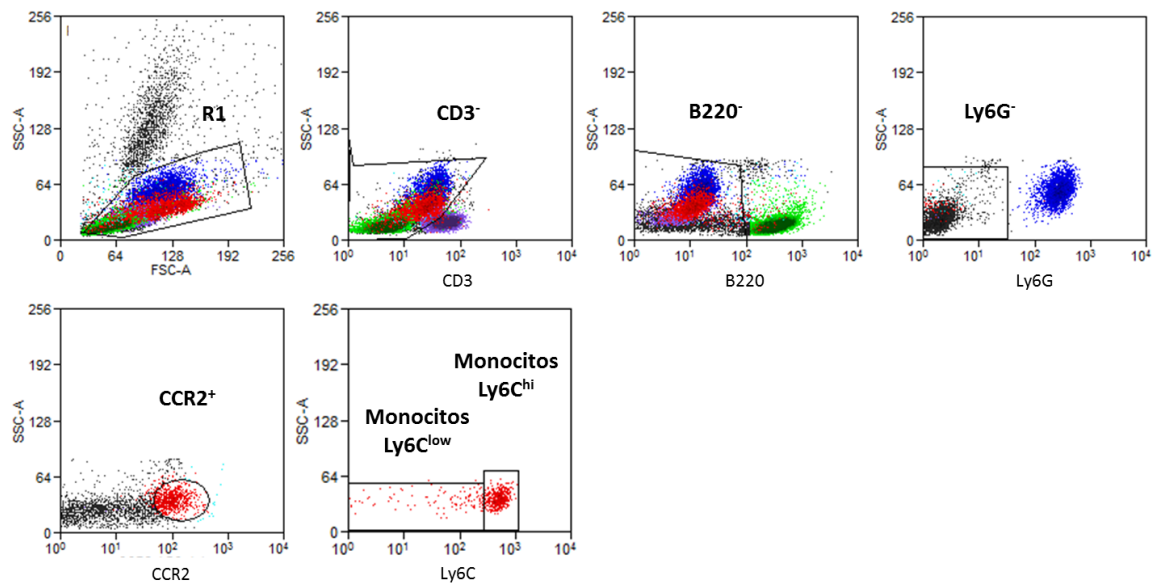


Figura 27. Marcadores utilizados para caracterizar neutrófilos en las muestras de sangre.

C) Análisis de la médula ósea

Del mismo modo que en los casos anteriores, una vez es seleccionada la región R1 que contiene las poblaciones a caracterizar, se realizó el análisis de cada una de ellas (Figura 28).

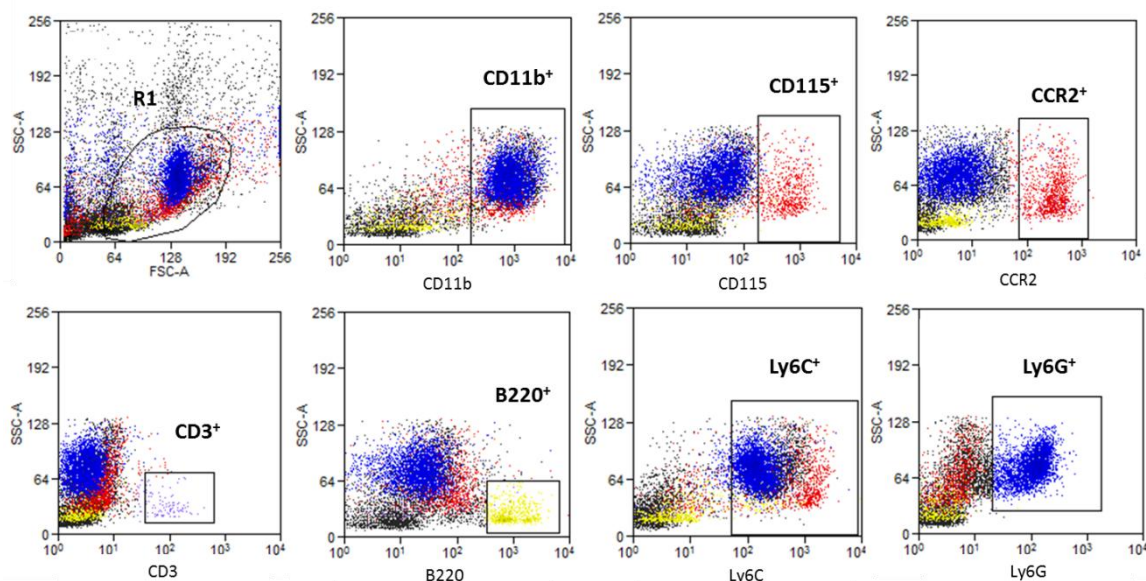


Figura 28. Marcadores utilizados para caracterizar las poblaciones de interés en la médula ósea.

Para definir las diferentes poblaciones se utilizó la siguiente caracterización.
Células B: B220⁺ (Figura 29).

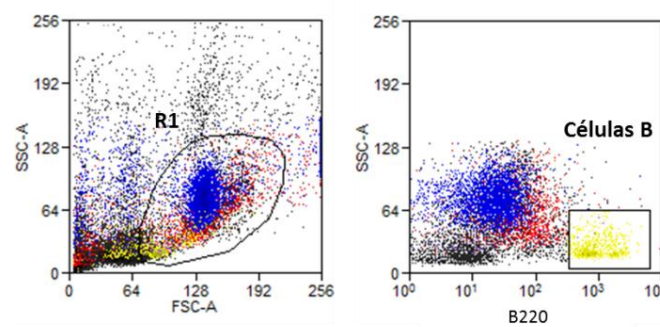


Figura 29. Marcadores utilizados para caracterizar linfocitos B en las muestras de médula ósea.

Células T: B220⁻ CD3⁺ (Figura 30).

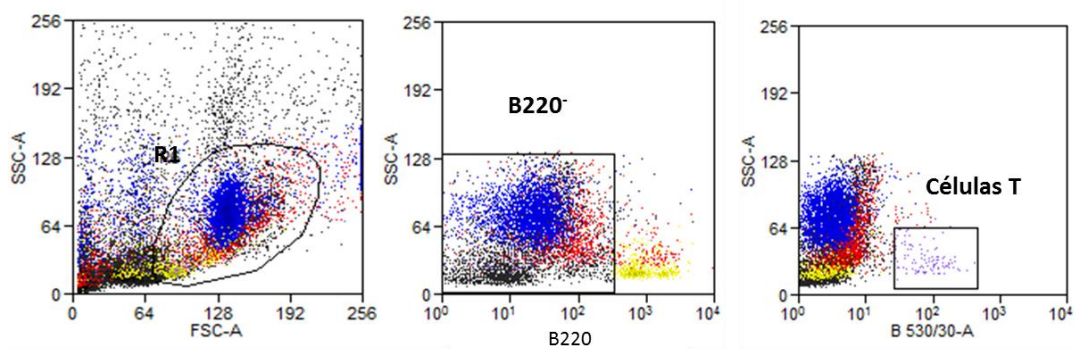


Figura 30. Marcadores utilizados para caracterizar linfocitos T en las muestras de médula ósea.

Neutrófilos: Ly6G⁺ (Figura 31).

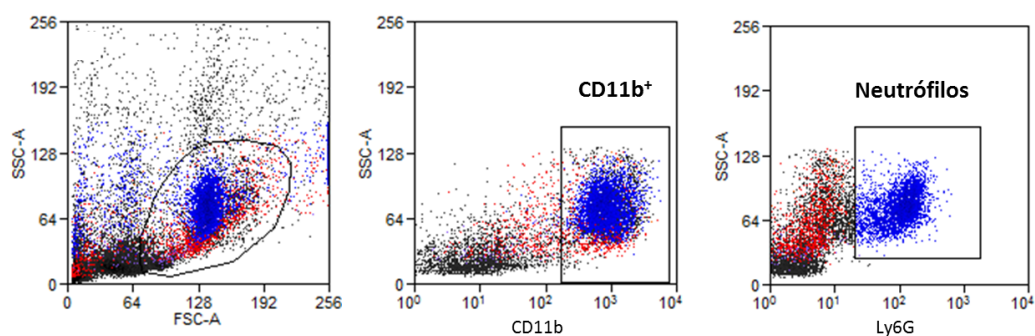


Figura 31. Marcadores utilizados para caracterizar neutrófilos en las muestras de médula ósea.

Monocitos: $CD11b^+ CD115^+ CCR2^+ Ly6G^- Ly6C^{hi}$ (Figura 32).

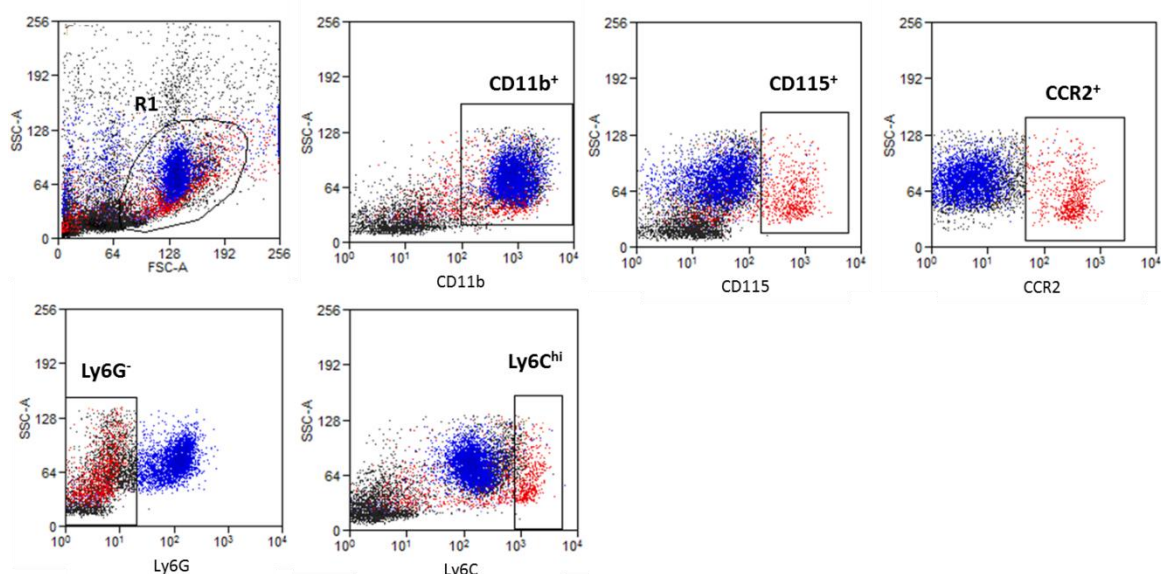


Figura 32. Marcadores utilizados para caracterizar monocitos en las muestras de médula ósea.

D) Análisis de fenotipo de neutrófilos

Al igual que se analizó la población de neutrófilos totales, tanto en sangre como en cerebro, finalmente se incluyó el marcador YM1 como marcador de fenotipo alternativo (Cuartero et al., 2013) para este tipo celular. Las células positivas se clasificaron como N2, y las negativas, como N1 (Figura 33).

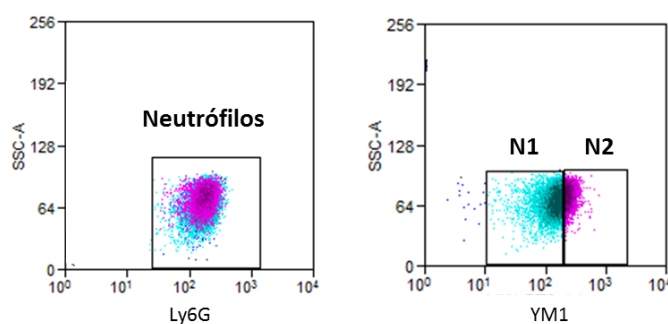


Figura 33. Análisis del fenotipo de los neutrófilos por citometría de flujo.

2.2.7. Análisis bioinformático de la expresión génica global con microarrays.

Los datos brutos se procesaron con el algoritmo RMA incluido en Affymetrix® Expression Console™ para la normalización y el análisis de nivel de genes. Para cada condición experimental, se procesaron y analizaron tres experimentos de microarrays correspondientes a tres repeticiones de ARN

independientes. Los cambios en el ratio entre las condiciones experimentales se calcularon como un cociente entre la media de las señales de expresión génica. El análisis estadístico se realizó con el paquete LIMMA (www.babelomics.org). Los valores con un valor de $p \leq 0,05$ se consideraron significativos. Los genes con un ratio KO vs WT ≥ 2 o $\leq 0,5$ se incluyeron para un análisis posterior. Para el análisis GO se utilizó la web DAVID y para el análisis de transcriptomas y el *clúster* jerárquico se utilizó la herramienta WebMeV (Multiple Experiment Viewer).

2.2.8. Estadística

Los datos se analizaron utilizando el programa PRISM 5.0 (GraphPad Software Inc., EE.UU.). Se realizó una t de Student para comparar dos grupos y un ANOVA de una sola vía o dos, seguido de una prueba *post-hoc* de Neuman-Keuls para comparar más de dos grupos, o seguido de una prueba de Bonferroni si se trata de una ANOVA de dos vías (dos variables), según proceda. En caso de ser necesario, se realizó una correlación de Pearson y se procedió a un análisis de regresión lineal. Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (ESM) y una $p < 0.05$ se asumió como estadísticamente significativa

3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y PROTOCOLO

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL BLOQUE I

Para estudiar el efecto del receptor TLR4 en el fenómeno de TH se escogió como base el modelo tromboembólico *in situ* (Orset et al., 2007), explicado en el punto 1.3 de Materiales y Métodos.

Los animales se distribuyeron en tres grupos experimentales atendiendo al tratamiento (salino o t-PA a los 20 min o a las 3 h) y a la perfusión o no perfusión de la arteria (Figura 34).

- MCAO: Grupo de isquemia permanente, tratado con salino a los 20min de la oclusión arterial (n=13).
- t-PA 20min: Grupo tratado y reperfundido con t-PA a los 20 min de la oclusión (n=11).
- t-PA 3h: Grupo tratado y reperfundido con t-PA a las 3 h de la oclusión (n=10).

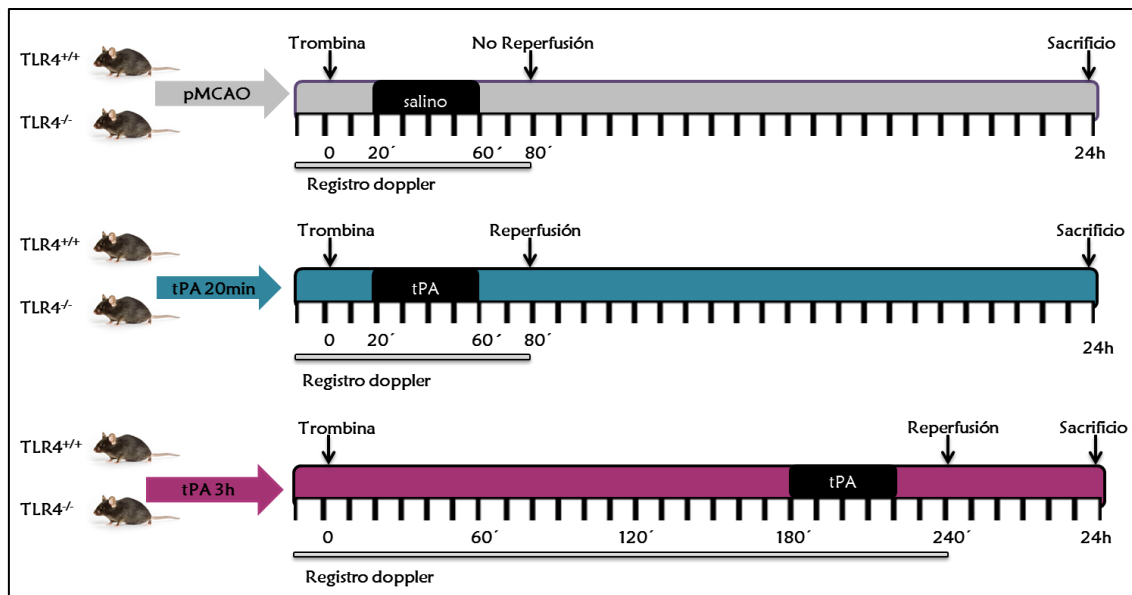


Figura 34. Protocolo experimental seguido para el modelo de TH. Grupos experimentales durante la fase de recanalización con t-PA: MCAO, grupo control tratado con salino; t-PA 20min, grupo de reperusión temprana; t-PA 3h, grupo de reperusión tardía.

Además, se establecieron los siguientes criterios de exclusión (casos que no fueron considerados para las determinaciones posteriores):

- Oclusión o reperusión parcial: Cuando no se producía bien la isquemia, bien la recanalización de todas las ramas arteriales.
- Daño estriatal: Probablemente debida a que se ocluyó, no sólo el tronco común de la ACM, sino también las arterias lenticuloestriales (más basales).
- Hemorragia extraparenquimal: Probablemente debida a un daño vascular durante la inyección o a un daño quirúrgico y/o posterior tratamiento con t-PA.

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL BLOQUE II

Para el estudio del papel del receptor TLR4 en la infiltración aguda tras el ictus experimental se utilizó una variante del modelo de isquemia permanente descrito en el punto 1.2 y se llevaron a cabo dos aproximaciones. En la primera, se evaluó el efecto de este receptor en la infiltración de las principales células circulantes, tras 48 horas de la isquemia experimental. En la segunda, se caracterizó la población de neutrófilos y su polarización.

3.2.1. Grupo experimental I: Evaluación de la implicación del receptor TLR4 en la infiltración de células y la polarización de neutrófilos tras MCAO.

- Grupo de animales MCAO: animales salvajes que expresan el receptor TLR4 (TLR4^{+/+}) y animales que no expresan este receptor (TLR4^{-/-}), sometidos a MCAO.

Siguiendo este protocolo experimental, se llevaron a cabo las siguientes determinaciones explicadas en los apartados 1 y 2 de Materiales y Métodos:

- Volumen de infarto por tinción de Nissl y MRI a 24h post isquemia.
- Análisis de las poblaciones celulares en los diferentes tejidos por citometría de flujo 48h post-isquemia.
- Análisis de las poblaciones de neutrófilos y su polarización en sangre y cerebro mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica a las 24 y 48h post-isquemia.
- Análisis de la expresión génica global de neutrófilos de sangre mediante microarrays.
- Caracterización de los marcadores de superficie de las distintas poblaciones de neutrófilos en sangre y tejido cerebral.

El esquema del sacrificio y recogida de muestras se esquematiza en la Figura 35.

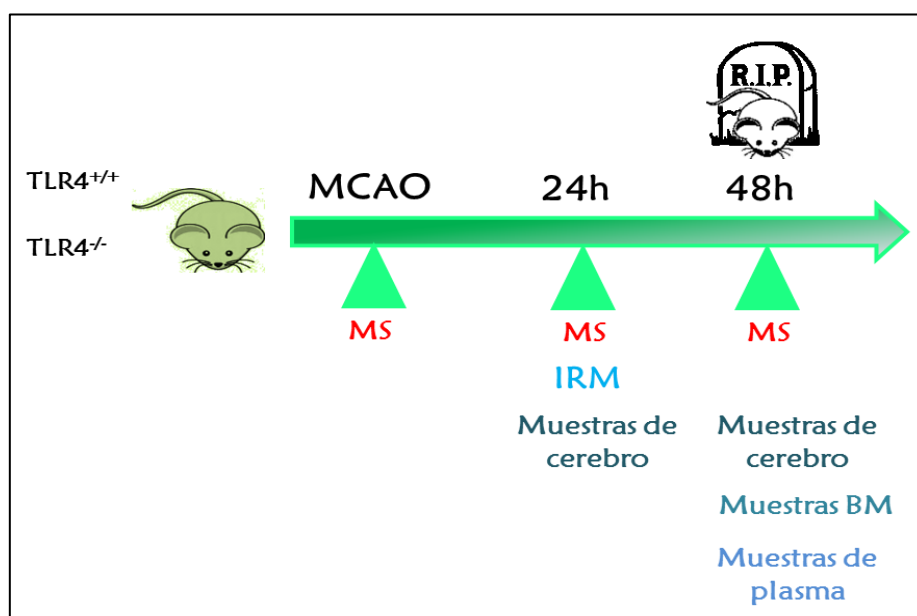


Figura 35. Protocolo experimental seguido para estudiar la implicación de TLR4 en la infiltración de células y la polarización de neutrófilos tras isquemia experimental. MS (muestra de sangre); IRM (resonancia magnética).

3.2.2. Grupo experimental II: Protocolo de eliminación de neutrófilos.

- Grupo de animales TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} MCAO: tratados i.p. (intraperitoneal) con anticuerpo anti-Ly6G (clon 1A8) 24 horas antes de la cirugía, 10 minutos tras la oclusión de la ACM y 24 horas tras la isquemia (Figura 36).
- Grupo de animales TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} MCAO: grupos controles, tratados i.p. con un anticuerpo isotópico anti-IgG2A siguiendo las mismas pautas que en el grupo anterior (Figura 36).

Siguiendo este protocolo experimental, se llevaron a cabo las siguientes determinaciones explicadas en los apartados 1 y 2 de Materiales y Métodos:

- Análisis del volumen de infarto por MRI a 24h post isquemia.
- Evaluación de los déficits neurológicos.

El esquema del sacrificio y recogida de muestras se esquematiza en la Figura 36.

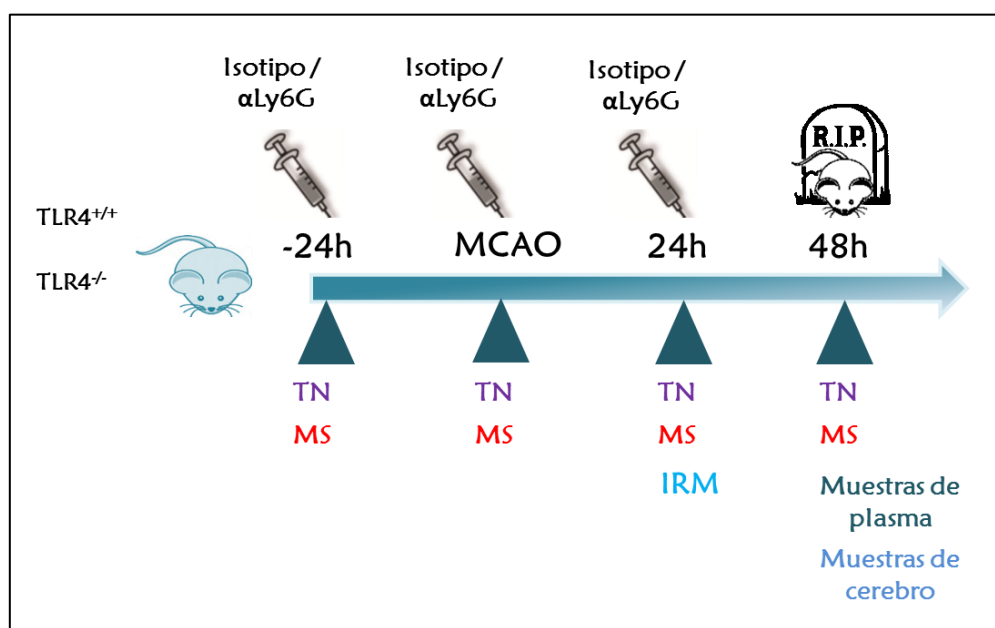


Figura 36. Protocolo experimental seguido para la eliminación de neutrófilos. IRM (resonancia magnética), MS (muestras de sangre), TN (Test neurológico).

3.2.3 Grupo experimental III: Evaluación del receptor TLR4 de células mieloides y de plaquetas en el volumen de infarto, infiltración, y polarización de neutrófilos tras isquemia experimental.

- Grupo de animales MCAO: animales salvajes ($TLR4^{loxP/loxP}$, $TLR4^{Pf4-cre}$ y $TLR4^{Lys-cre}$) y nulos para el receptor TLR4 de cada tipo celular ($TLR4^{loxP/Pf4-cre}$ y $TLR4^{loxP/Lys-cre}$) sometidos a MCAO.

Para determinar el volumen de infarto por MRI y hacer el análisis de la polarización de neutrófilos mediante inmunohistoquímica explicada en el apartado 2 de Materiales y Métodos, los animales fueron sacrificados 48h post-isquemia

El esquema del sacrificio y recogida de muestras se esquematiza en la Figura 37.

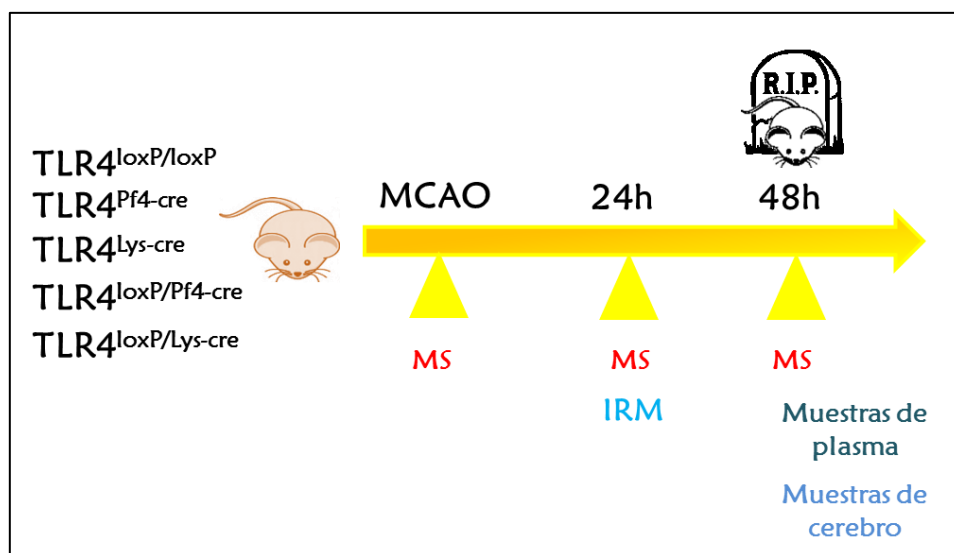


Figura 37. Protocolo experimental seguido para estudiar la implicación de TLR4 de neutrófilos y plaquetario en el volumen de infarto, infiltración, y polarización de neutrófilos tras isquemia experimental. IRM (resonancia magnética), MS (muestras de sangre).

RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL EFECTO DEL RECEPTOR TLR4 EN EL FENÓMENO DE TH

1.1. MODELO TROMBOEMBOLICO IN SITU: PORCENTAJES DE SUPERVIVENCIA Y ÉXITO

Como se ha descrito anteriormente, se decidió trabajar con un protocolo de administración temprana de t-PA (a los 20 minutos) y otro de administración tardía (a las 3 horas), comparando ambos tratamientos y genotipos siempre con un grupo control de cada genotipo, tratado con vehículo (isquemia permanente).

La concentración de trombina elegida (2 UI/ μ l) produjo una oclusión estable en el 92% de los casos de ratones TLR4^{+/+}, y en el 88% en los TLR4^{-/-} (Figura 38), caracterizada según los criterios visuales y de láser-doppler ya descritos con anterioridad. El 8% y el 12% restante, respectivamente, reperfundió de manera espontánea durante la primera hora de isquemia. Estos animales (grupo **Reperusión Espontánea**) se descartaron de todas las determinaciones posteriores.

Además, el tratamiento con t-PA a los 20 min de la oclusión logró una recanalización arterial exitosa en el 65% de los animales TLR4^{+/+}, siendo el porcentaje un poco mayor, 78%, en los animales TLR4^{-/-}.

En cuanto a los grupos de reperusión de 3h, la reperusión ocurrió en porcentajes similares; los animales TLR4^{+/+} no reperfundieron en un 45% de los casos, y los animales TLR4^{-/-}, en un 53% de los casos.

En todos los casos (Figura 38), los animales del grupo **No Reperusión** fueron excluidos de todas las determinaciones posteriores.

Pese a que el porcentaje de supervivencia fue bastante alto, la amplia variedad de respuestas al tratamiento con t-PA hizo que el porcentaje de éxito global del modelo fuera menor al 50%.

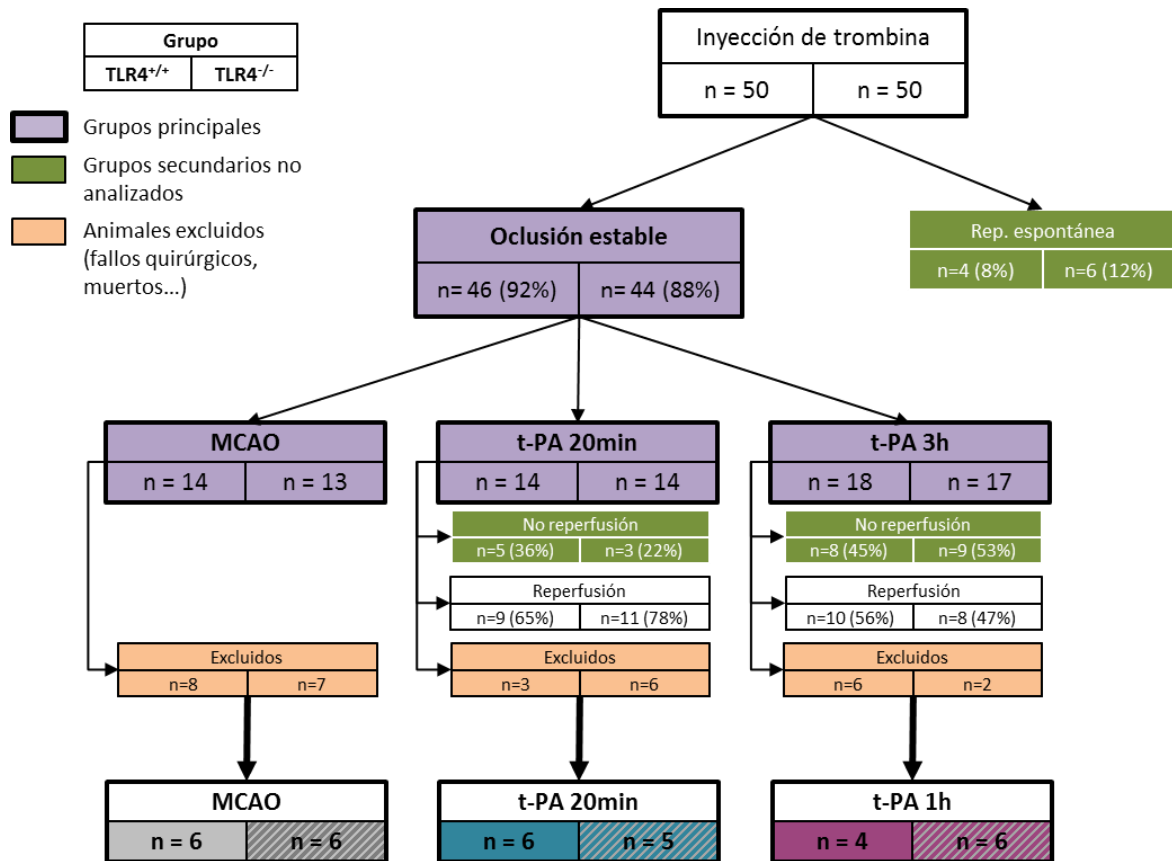


Figura 38. Cuadro explicativo de las consideraciones generales del modelo tromboembólico *in situ*, en el que se aprecian los porcentajes de oclusión, reperusión, supervivencia y éxito del modelo.

Criterios de exclusión:

- Reperusión espontánea: animales en los que la perfusión se detuvo transitoriamente, pero volvió espontáneamente a los valores basales en ausencia de t-PA dentro de los 60 minutos tras la inyección de trombina.
- No reperusión: ratones que no presentaron reperusión después de la inyección de t-PA.

Los dos últimos grupos de exclusión se establecieron después del análisis de los resultados, y no fueron diseñados inicialmente.

Algunos ratones se excluyeron de un análisis posterior de acuerdo con los siguientes criterios:

- Cuando la MCAO causó un infarto que afectó el estriado, probablemente debido a una oclusión del tronco común de la MCA, pero también de las arterias lenticulostriatales.

d) Cuando los ratones sufrieron una hemorragia extraparenquimatosa, probablemente debido al daño quirúrgico de la arteria.

Parámetros sanguíneos

Comparando con los niveles basales medidos, los parámetros sanguíneos (pH, temperatura, pCO₂ y pO₂, hematocrito, hemoglobina y PAM) no variaron significativamente durante los diferentes tiempos y en todos los grupos estudiados. El tratamiento con t-PA tampoco alteró los parámetros respecto a los controles y el genotipo (Tabla 6).

Tabla 6: Parámetros sanguíneos.

	TLR4 ^{+/+}			TLR4 ^{-/-}		
	Antes de MCAO	Después de MCAO	Después de perfusión	Antes de MCAO	Después de MCAO	Después de perfusión
pH	7.26 ± 0.03	7.23 ± 0.05	7.28 ± 0.07	7.22 ± 0.04	7.18 ± 0.05	7.24 ± 0.05
pCO ₂ Arterial (mm Hg)	25.86 ± 1.62	22.85 ± 2.00	24.13 ± 2.53	27.66 ± 3.01	25.39 ± 2.50	26.19 ± 2.41
pO ₂ Arterial (mm Hg)	213.22 ± 10.35	198.81 ± 7.26	193.02 ± 9.46	199.58 ± 8.11	201.61 ± 9.81	199.79 ± 3.67
Hematocrito	32.95 ± 2.18	24.90 ± 1.96	29.57 ± 2.67	34.95 ± 1.31	23.98 ± 1.27	31.95 ± 2.63
Hemoglobina	13.56 ± 0.90	10.78 ± 1.81	10.39 ± 0.77	12.31 ± 1.94	13.50 ± 2.30	12.95 ± 0.96
PAM (mm Hg)	73.23 ± 2.78	70.01 ± 4.59	53.49 ± 3.87	71.87 ± 3.46	69.87 ± 2.45	56.79 ± 3.66
Temperatura	36.05 ± 0.4	36.81 ± 0.33	37.05 ± 0.23	36.52 ± 0.51	36.91 ± 0.31	37.41 ± 0.26

Valores expresados como media ± SEM.

PAM indica presión arterial media.

1.2. EFECTO DE TLR4 Y DE LA REPERFUSIÓN SOBRE EL VOLUMEN DE INFARTO

En los ratones TLR4^{+/+}, tras la perfusión temprana con t-PA (20 min) mediante oclusión tromboembólica *in situ* de la MCA, se observó una disminución en el volumen de infarto en comparación con los animales control (MCAO) (Figura 39 A-B; P<0.05 vs. TLR4^{+/+}), mientras que la recanalización tardía (3h) no modificó el tamaño de la lesión (Figura 39 A-B; P>0.05), como ya se demostró previamente (García-Yébenes et al., 2011). En los ratones TLR4^{-/-}, la oclusión produjo un infarto significativamente más pequeño que el de los ratones TLR4^{+/+} (Figura 39 A-B; P<0.05), corroborando nuestros resultados previos en un modelo experimental diferente (Caso et al., 2007). Es importante destacar que ni la perfusión temprana

ni la tardía modificaron el tamaño de la lesión en estos animales TLR4^{-/-} (Figura 39 A-B; P>0.05 vs. TLR4^{-/-}).

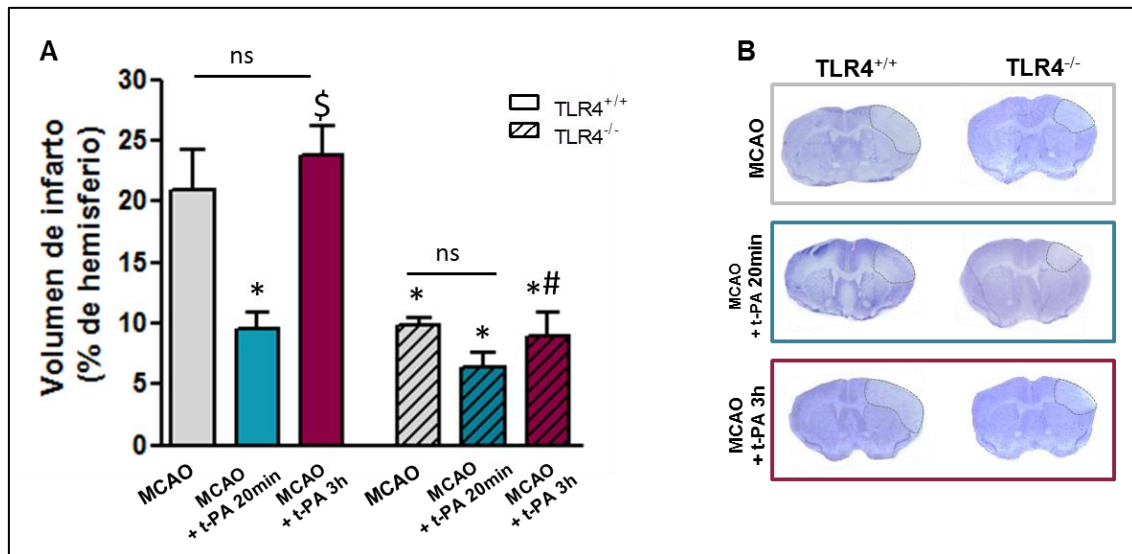


Figura 39. Efecto del receptor TLR4 en el volumen de infarto tras un modelo tromboembólico *in situ* con administración temprana y tardía de t-PA. A. Volúmenes de infarto, determinados 24 h tras la oclusión. Datos representados como la media \pm SEM. Estos datos fueron comparados con un test no paramétrico ANOVA de dos vías seguido por el test post-hoc de Bonferroni (n=4-6; *P<0.05 vs. MCAO TLR4^{+/+}; \$P<0.05 vs. MCAO t-PA 20min TLR4^{+/+}; #P<0.05 vs. MCAO t-PA 3h TLR4^{+/+}). El test ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo del genotipo de los ratones (F (1, 18) =35.22; P<0.0001), de la reperusión con t-PA (F (2, 18) =10.59; P=0.0009) y la interacción del genotipo con la reperusión con t-PA (F (2, 18) =4.52; P=0.0258). **B.** Fotos representativas de los volúmenes de infarto, observados por la tinción de Nissl, de cada grupo experimental.

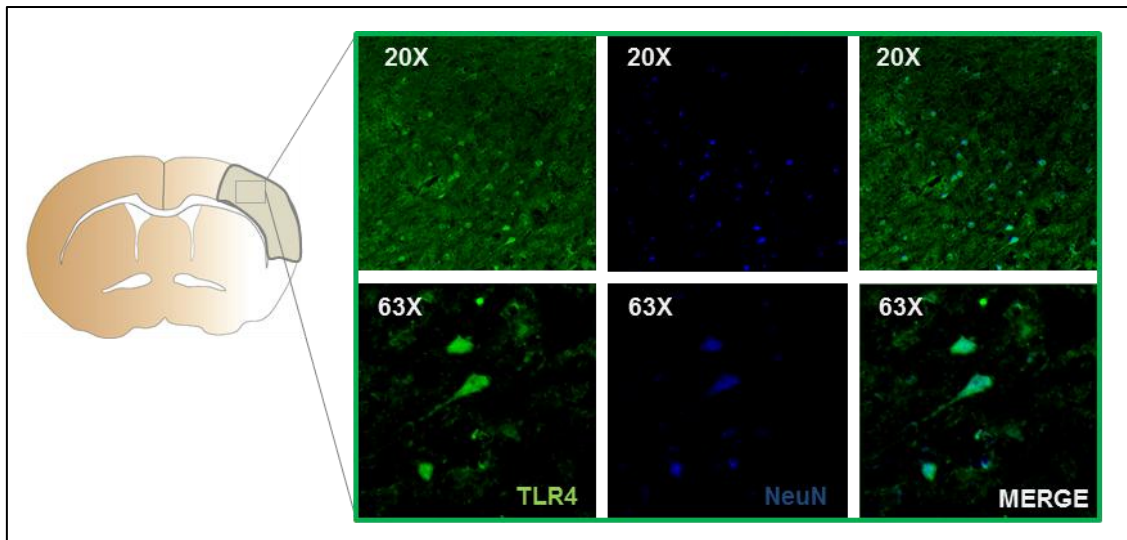


Figura 40. Doble inmunoistoquímica de TLR4 y NeuN (neurona). Imágenes tomadas en el grupo de animales TLR4^{+/+} MCAO + t-PA 3h, 24 horas después del daño isquémico.

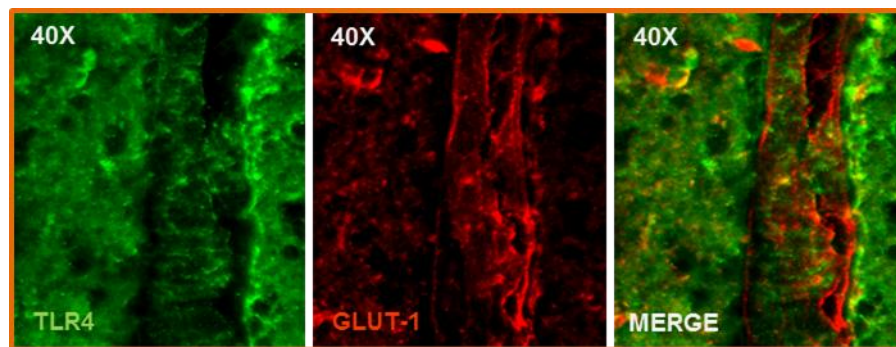


Figura 41. Doble inmunoistoquímica de TLR4 y GLUT-1 (endotelio vascular). Imágenes tomadas en el grupo de animales TLR4^{+/+} MCAO + t-PA 3h, 24 horas después del daño isquémico.

En estos animales, la expresión de TLR4 se encontró principalmente en neuronas (Figura 40). Aunque también se observó marcaje de este receptor asociado a las paredes de los vasos que se encuentran en el infarto (Figura 41).

1.3. EFECTO DE TLR4 Y DE LA REPERFUSIÓN EN LA TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA

Los ratones TLR4^{+/+} mostraron signos leves de transformación hemorrágica (TH) con un pequeño área de sangrado 24 horas después de la oclusión de la ACM. Tras la reperfundición temprana (20 min), tanto la severidad de la hemorragia como el área de ésta fueron similares a las del grupo control MCAO (Figura 42 A; $P > 0.05$),

mientras que en el grupo de recanalización tardía (3h) por t-PA se observó un aumento de hemorragias severas, infarto hemorrágico tipo 2 (H-II) y hemorragia parenquimal tipo 1 (HP-I) (Figura 42 B). Por el contrario, los ratones $TLR4^{-/-}$ con administración tardía de t-PA no mostraron incremento en el área de hemorragia ni en la aparición de hemorragias severas (Figura 42 A-B).

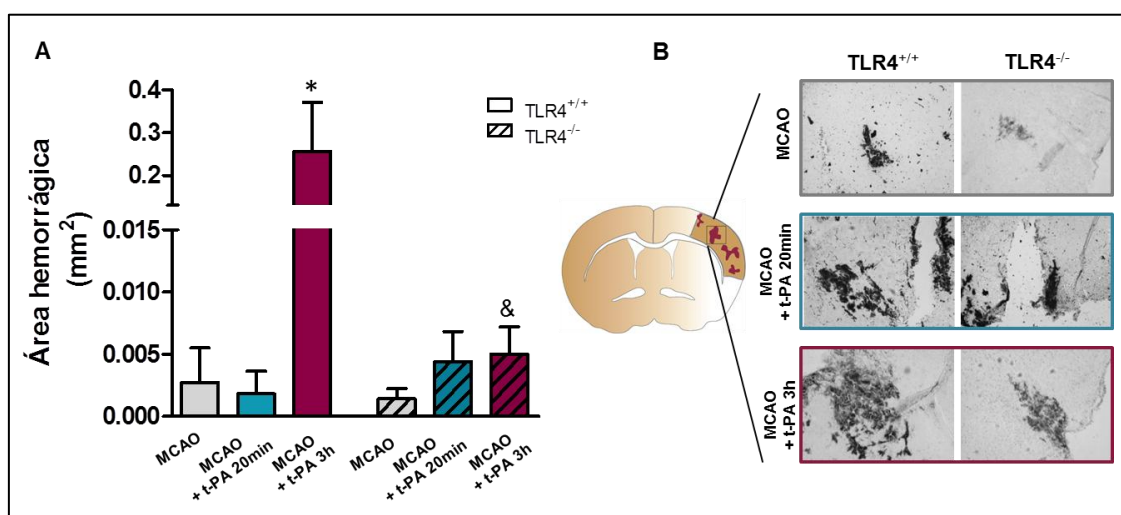


Figura 42. Efecto del receptor TLR4 en la transformación hemorrágica tras la administración temprana y tardía de t-PA en un modelo tromboembólico *in situ*. **A.** Áreas de hemorragia, determinadas 24 h tras la oclusión. Datos representados como la media \pm SEM. Estos datos se compararon con un test no paramétrico ANOVA de dos vías seguido por el test post-hoc de Bonferroni ($n=4-6$; * $P<0.05$ vs. MCAO $TLR4^{+/+}$; & $P<0.05$ vs. MCAO t-PA 3 h $TLR4^{+/+}$). El test ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo del genotipo de los ratones ($F(1, 19)=5.12$; $P=0.0355$), de la perfusión con t-PA ($F(2, 19)=5.57$; $P=0.0125$) y la interacción del genotipo con la perfusión con t-PA ($F(2, 19)=5.39$; $P=0.0140$). **B.** Fotos representativas de la tinción con diaminobencidina (DAB) de cada grupo experimental.

Puesto que la reducción en el área de hemorragia podría ser una consecuencia de la disminución del tamaño de la lesión, los datos se normalizaron dividiendo el tamaño de la hemorragia por el tamaño del infarto para cada animal para evitar este sesgo. Es importante destacar que, después de la normalización por el tamaño del infarto, la hemorragia se mantuvo igualmente reducida de forma significativa (Figura 43; $P<0,05$).

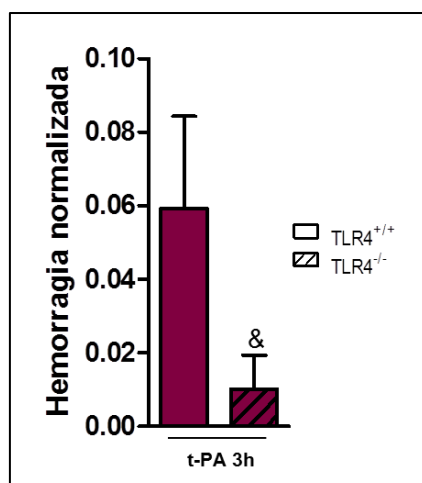


Figura 43. Normalización del área de hemorragia por el volumen de volumen de infarto en el grupo de reperusión tardía. Los datos se analizaron por t de Student (&P<0.05 versus t-PA 3 h TLR4^{+/+}).

La tinción de los eritrocitos permitió la observación del sangrado y su clasificación en los diferentes tipos de éste (ver Métodos). Los grupos MCAO presentaron un sangrado tipo moderado (Figura 48) que, en el caso de los TLR4^{+/+}, fue de tipo HI-I en un 70-80% y del tipo HI-II en un 20%, caracterizado por la presencia de petequias más confluentes en la zona de la lesión. En los animales TLR4^{-/-}, sin embargo, fue sin lesión en un 40% y de tipo moderado HI-I en un 60%.

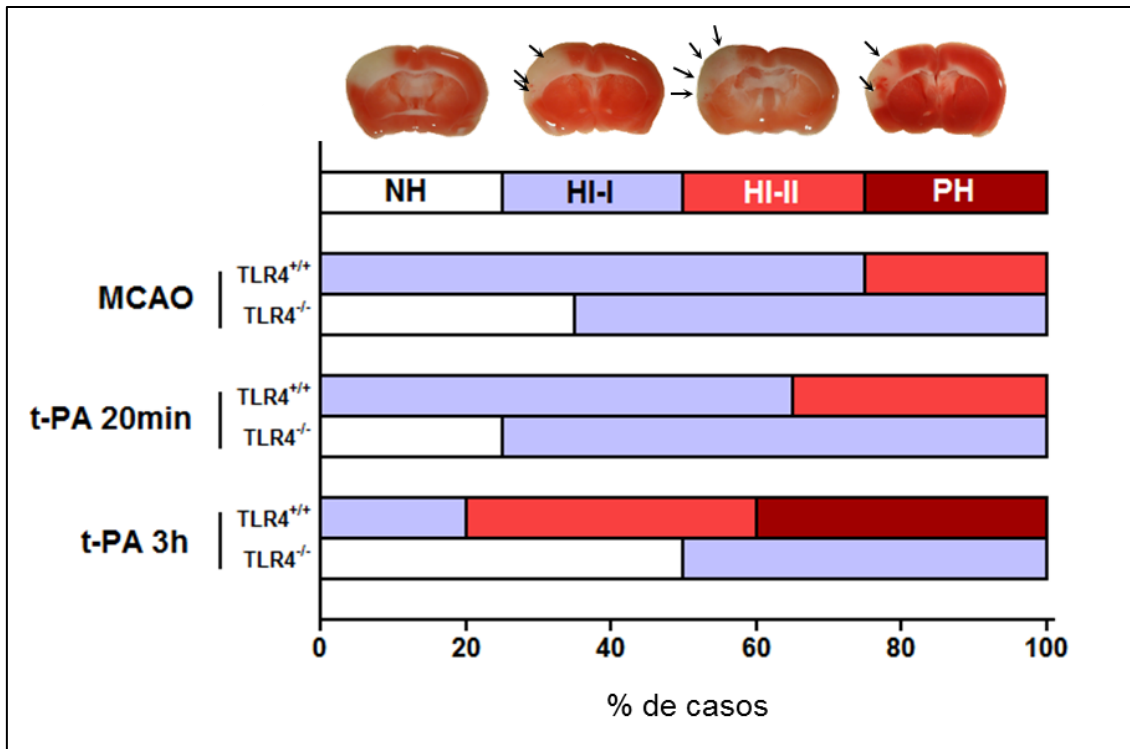


Figura 44. Efecto del receptor TLR4 y de la reperusión en la clasificación histológica de la hemorragia. La clasificación se realizó atendiendo al tipo de sangrado en NH, no hemorragia; HI-I, infarto hemorrágico-1; HI-II, infarto hemorrágico-2, y PH, hemorragia parenquimal.

La reperusión temprana (t-PA 20min) presentó valores semejantes a los MCAO en ambos casos, aumentando en el caso del grupo TLR4^{+/+} a, en un 40% de los casos aproximadamente, las lesiones de tipo HI-II.

La reperusión tardía (t-PA 3h) provocó un aumento claro del volumen de hemorragia en el grupo de ratones TLR4^{+/+}, presentándose los sangrados en situación más profunda, cerca del cuerpo calloso (Figura 42 B), y siendo entre un 70-85% del tipo más grave, HI-II y PH (Figura 44), caracterizado por la presencia de grandes agrupaciones de eritrocitos. Por el contrario, en los ratones TLR4^{-/-} no se observaron estos tipos de lesiones, y los tipos de sangrados se mantuvieron en porcentajes similares a los del grupo MCAO (Figura 44).

1.4. EFECTO DE TLR4 EN EL DAÑO A LA BHE, EN LA INFILTRACIÓN DE LEUCOCITOS Y EN LA EXPRESIÓN DE MMP9 TRAS LA ADMINISTRACIÓN TARDÍA DE T-PA (3H).

Para evaluar la funcionalidad de la BHE se realizó la tinción por inmunofluorescencia de la IgG extravasada del propio plasma, que se cuantificó por

el principio de Cavalieri (Figura 45 B). En los ratones $TLR4^{-/-}$ con reperusión tardía, el área de IgG extravasada fue mucho menor que la que presentaron los ratones $TLR4^{+/+}$ (Figura 45 A-B; $P<0.05$).

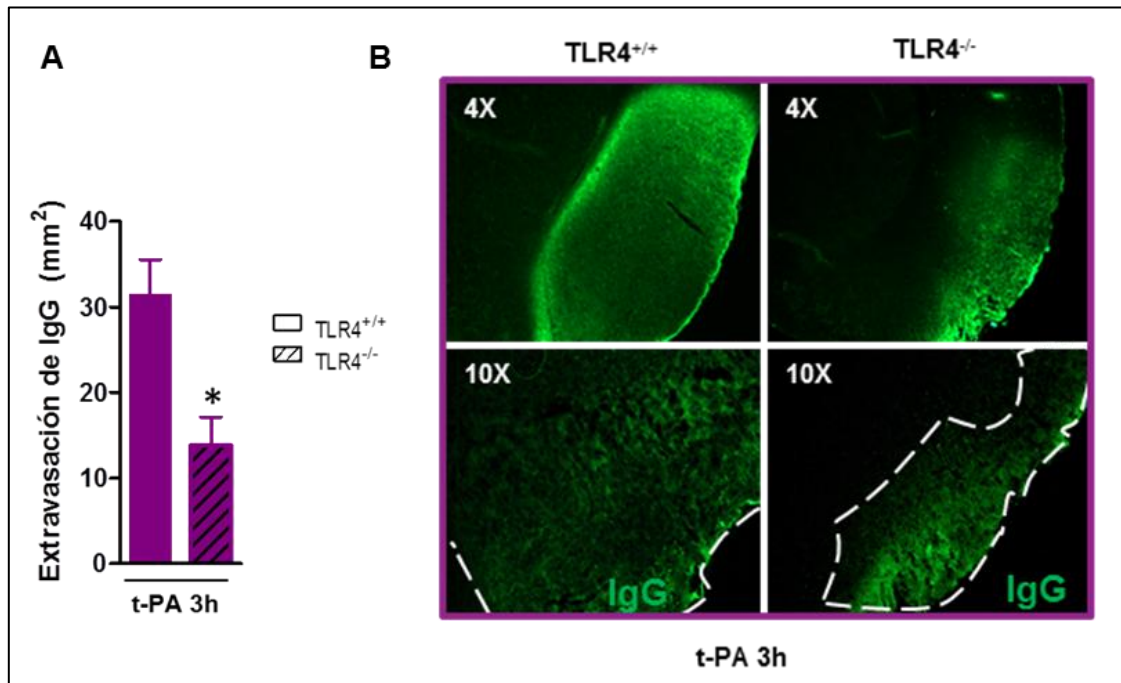


Figura 45. Efecto del receptor TLR4 sobre la extravasación de IgG. **A.** Área de extravasación de la IgG, 24h tras la isquemia en los grupos de MCAO + t-PA 3h. Datos representados como la media \pm SEM; $n=4-6$; t-test * $P<0.05$ versus t-PA 3h $TLR4^{+/+}$. **B.** Imágenes representativas del marcaje en cada grupo de reperusión tardía.

Seguidamente nos planteamos estudiar el estado de alguno de los mediadores de la TH. Entre ellos, elegimos el número de neutrófilos infiltrados, cuantificados como el número de células NIMP-R14+, y los niveles de MMP-9, por densitometría, empleando inmunofluorescencia para ambas determinaciones. En el conteo de las células NIMP-R14+, no se observaron diferencias significativas en la infiltración de neutrófilos entre ambos grupos tras la recanalización tardía de la arteria (Figura 46 A-B).

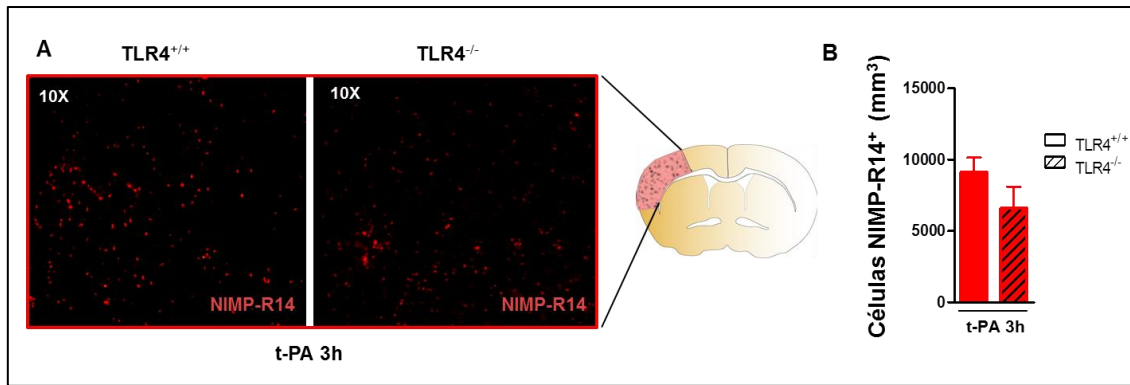


Figura 46. Infiltración de neutrófilos en el hemisferio isquémico. **A.** Los datos se obtuvieron 24 horas después de la isquemia y se representan como la media \pm SEM; N=4-6; t-test * $P < 0,05$ versus t-PA 3h TLR4^{+/+}. **B.** Imágenes representativas de la infiltración de neutrófilos en el infarto de cada grupo de perfusión tardía con t-PA.

Por último, la densitometría obtenida de la inmunofluorescencia de MMP-9 mostró una reducción significativa de la expresión de esta proteasa en animales TLR4^{-/-} después de la administración tardía de t-PA (t-PA 3h), comparado con el grupo de animales TLR4^{+/+} (Figura 47 A-B; $P < 0.05$).

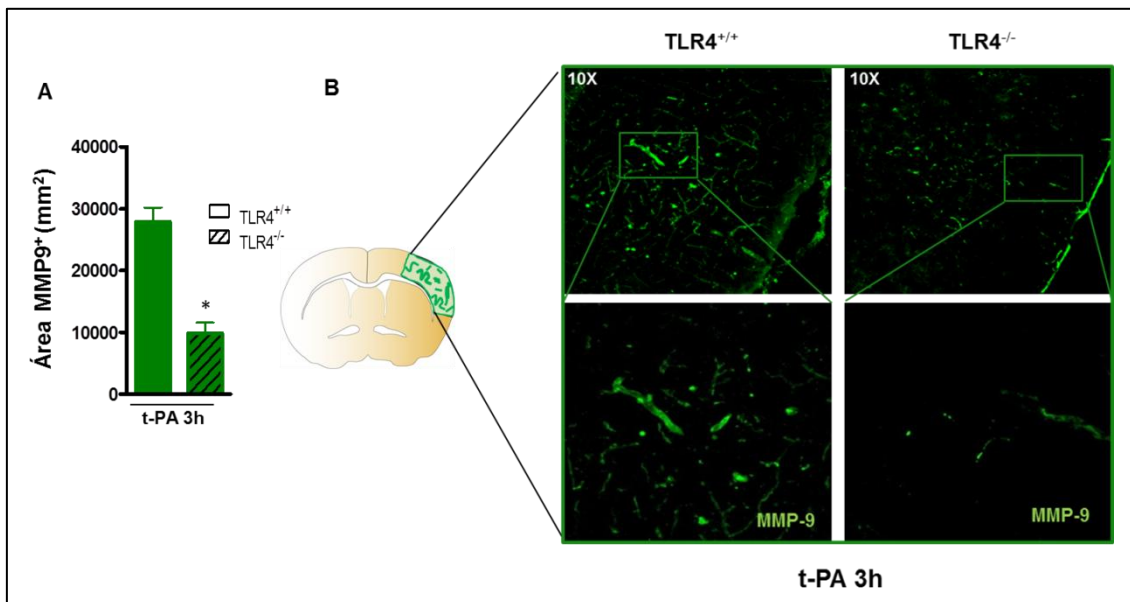


Figura 47. Expresión de MMP9 en el hemisferio isquémico. **A.** Densitometría del área de MMP9. Los datos se obtuvieron 24 horas después de la isquemia y se representan como la media \pm SEM; N = 4-6; t-test * $P < 0,05$ versus t-PA 3h TLR4^{+/+}. **B.** Imágenes representativas de la expresión de MMP9 en los dos grupos analizados.

Por otra parte, la triple inmunofluorescencia realizada para comprobar si la MMP-9 se expresaba en neutrófilos (NIMP-R14) o en vasos (marcador endotelial del cerebro, GLUT-1) puso de manifiesto la co-localización entre MMP-9 y los vasos existentes en el infarto pero no entre MMP-9 y los neutrófilos infiltrados (Figura 48).

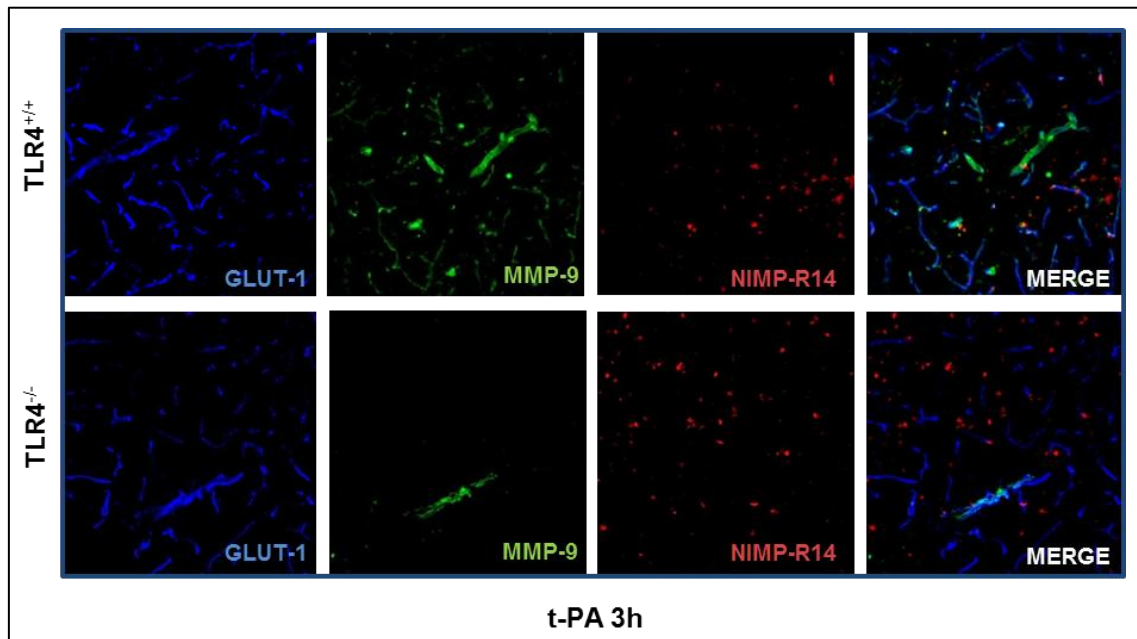


Figura 48. Triple inmunofluorescencia de MMP-9, NIMP-R14 (neutrófilos) y GLUT-1 (vasos). Imágenes representativas de cada grupo de reperusión tardía.

Es importante destacar que existe una correlación lineal entre la MMP9 y las áreas de hemorragia, que eran en su mayoría coincidentes (Figura 49 A-B).

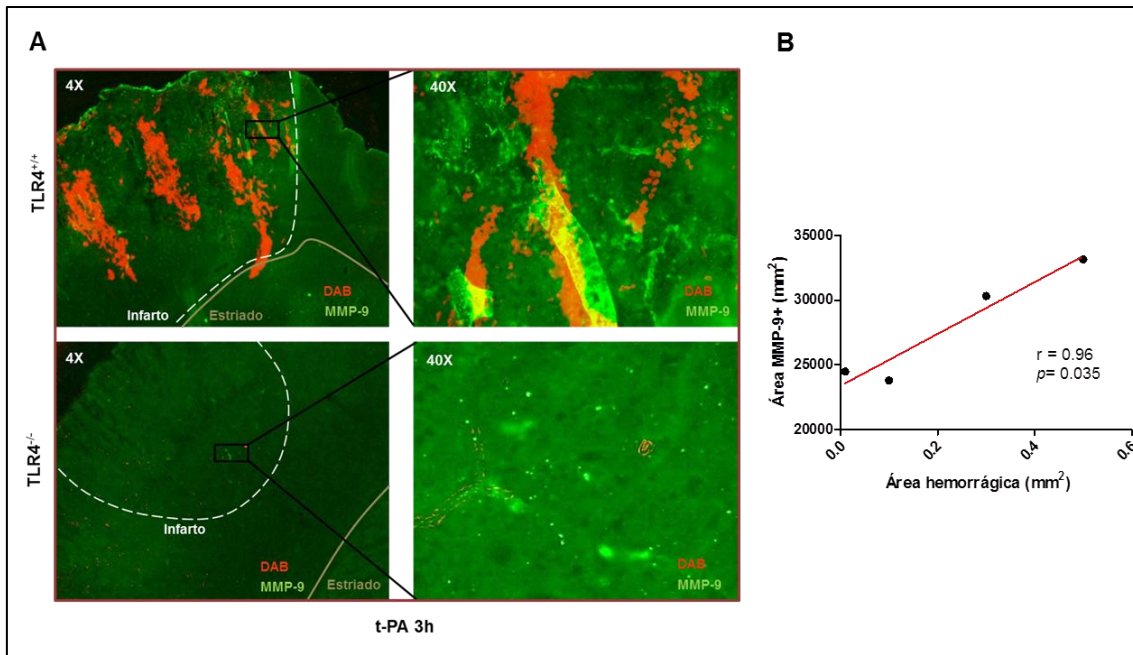


Figura 49. A. Imágenes representativas de la localización de MMP-9 y de la hemorragia (DAB), 24 horas después de la isquemia, en el grupo de animales TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} MCAO + t-PA 3h. **B.** Correlación lineal entre las áreas de expresión hemorrágica y las áreas de expresión de MMP9 en el grupo TLR4^{+/+} t-PA 3h de MCAO (n = 4, r de Pearson = 0.96, P = 0.035).

2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL RECEPTOR TLR4 EN LA INFILTRACIÓN AGUDA TRAS ICTUS

2.1. EFECTO DE TLR4 EN LA INFILTRACIÓN CELULAR

Para los estudios de infiltración se utilizó el modelo experimental de ligadura de la ACM (punto 3.2.1 de Materiales y Métodos). El estudio de la infiltración leucocitaria en el parénquima cerebral se llevó a cabo por citometría de flujo a partir de la disgregación del tejido cortical infartado (o el tejido equivalente en controles intactos).

Nuestros resultados muestran, como era de esperar, que la isquemia induce la infiltración de células en el tejido isquémico, como se pone de manifiesto por un número de células infiltradas en los animales isquémicos muy superior al de los animales controles, donde prácticamente no se detectan.

Mediante el análisis por citometría de flujo, en esta fase aguda encontramos dos fenotipos de células que expresan el marcador mieloide CD11b. La primera subpoblación y más numerosa eran células CD45^{low}, que han sido caracterizadas como microglía activada de la región isquémica (Campanella et al., 2002). La segunda subpoblación mieloide, con mayores niveles de CD45, coincide con lo que se ha definido como células de infiltración (Campanella et al., 2002).

2.1.1. Infiltración de MDMs Ly6C^{hi}

Los monocitos murinos se clasifican comúnmente en 2 subconjuntos de acuerdo con el nivel de expresión del marcador de superficie Ly6C. Los Ly6C^{hi} expresan altos niveles de CCR2 y son reclutados rápidamente a sitios de infección o inflamación. Por el contrario, los monocitos Ly6C^{lo} expresan bajos niveles de CCR2 y se cree que funcionan patrullando como células inmunes que migran a lo largo de la superficie luminal de los vasos sanguíneos (Shi and Pamer, 2011). En nuestro estudio, por tanto, decidimos centrarnos en la población de monocitos o MDMs Ly6C^{hi}. Ambos genotipos presentaron un aumento significativo de MDMs infiltrados en cerebro en comparación con los animales naïve (Figura 50 A-C; $P < 0.05$). En los animales TLR4^{+/+}, la población de macrófagos/monocitos Ly6C^{hi} fue

significativamente superior a la de los animales $TLR4^{-/-}$, 48 horas tras la isquemia (Figura 50 A; $P < 0.05$). Sin embargo, cuando normalizamos el número de células que se infiltran por mm^3 de infarto, estas diferencias desaparecen (Figura 50 B).

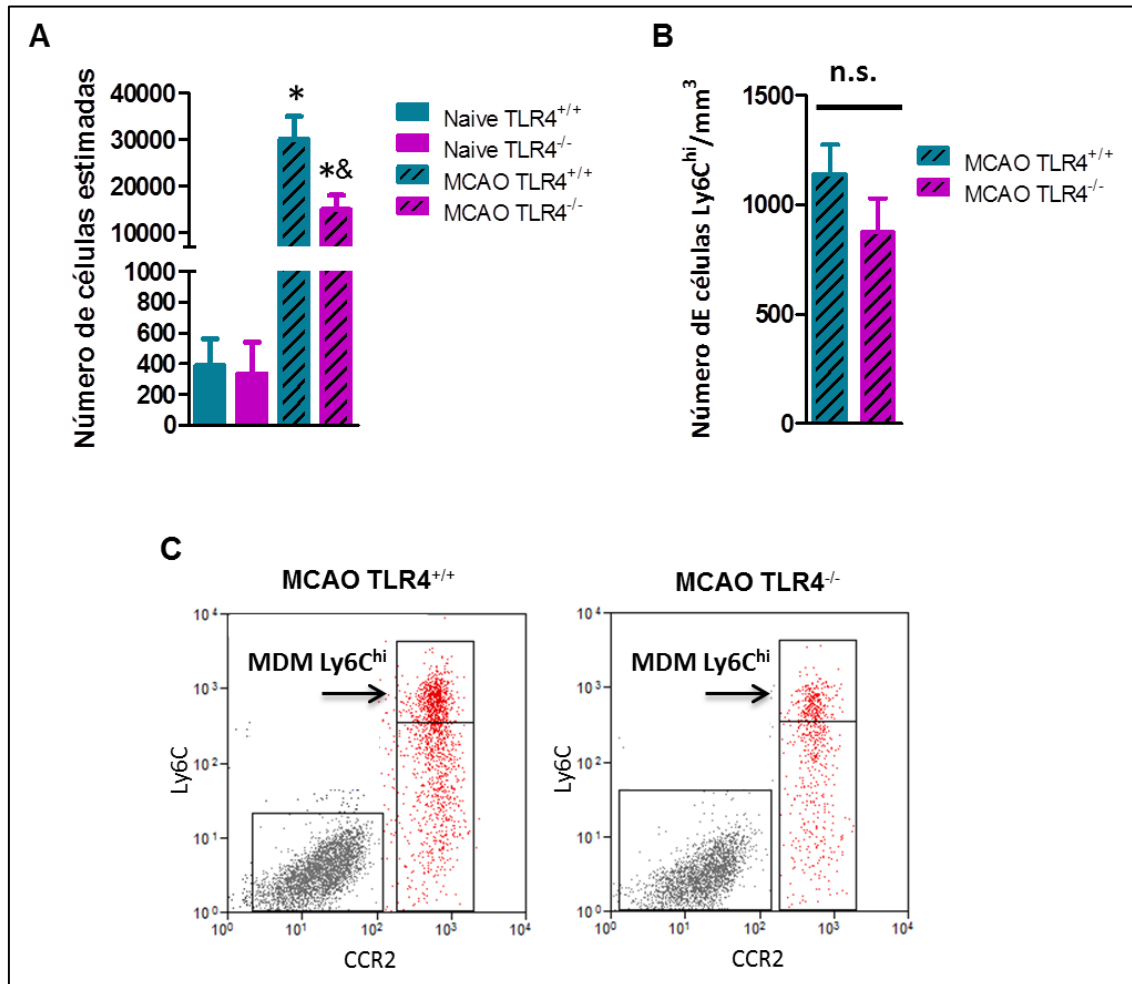


Figura 50. Efecto de TLR4 en la respuesta de los MDMs infiltrados. **A.** Infiltración de MDMs totales, determinado a las 48 h tras la oclusión de la ACM por citometría de flujo (ver apartado Materiales y Métodos). **B.** Normalización del número de células $Ly6C^{hi}$ por el volumen de infarto en mm^3 , en animales isquémicos de ambos grupos. Datos representados como la media \pm SEM. ($n=4-8$; $*P < 0.05$ vs. naïve; $\&P < 0.05$ vs. MCAO $TLR4^{+/+}$). **C.** Imágenes representativas del análisis de citometría, con el software Summit, de los grupos con isquemia.

2.1.2. Infiltración de neutrófilos

La isquemia indujo un aumento significativo en la población de neutrófilos, caracterizada por el marcaje positivo al marcador de células mieloides CD11b y el marcador de superficie Ly6G, tanto en animales $TLR4^{+/+}$ como $TLR4^{-/-}$ tras la

isquemia, comparado con los animales naïve, donde la población de neutrófilos en el parénquima cerebral fue muy inferior (Figura 51). A pesar de las diferencias en el volumen de infarto, no se observaron diferencias significativas en el número de neutrófilos infiltrados tras la isquemia entre los dos genotipos (Figura A-C). El aumento de neutrófilos se ha asociado con una mayor lesión tisular en el parénquima cerebral tras isquemia, como sucede en otras enfermedades (del Zoppo, 2010; Wang et al., 2007). Por ello, el hecho de que los animales TLR4^{-/-}, a pesar de tener un volumen de infarto significativamente inferior, presentara un número elevado de neutrófilos infiltrados en el cerebro, era contrario a lo esperado. Puesto que los neutrófilos infiltrados se localizan en el área infartada, decidimos realizar una normalización del número de neutrófilos que se infiltran por mm³ de volumen de infarto; así, observamos que en los animales que no expresan el receptor poseen una infiltración significativamente mayor de neutrófilos por mm³ (Figura 51 B; P<0.05).

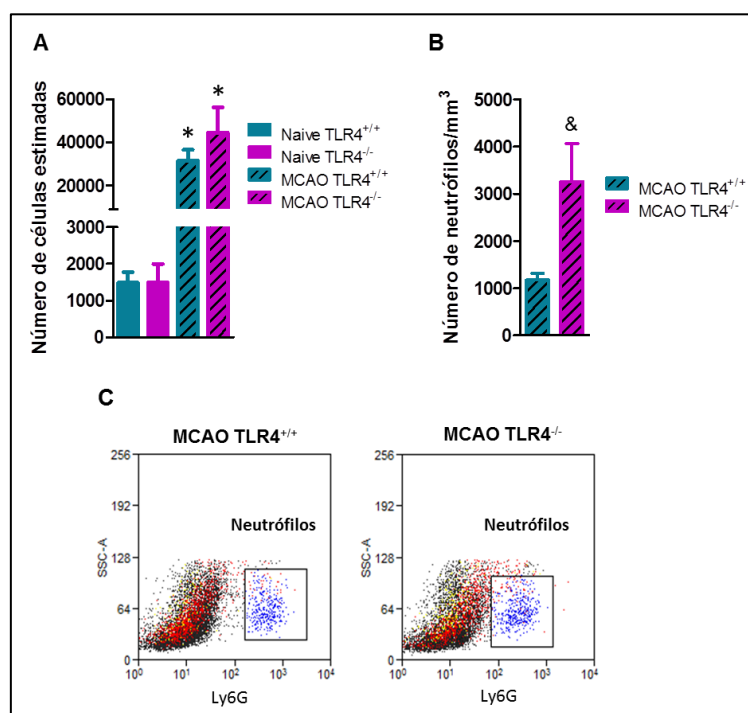


Figura 51. Efecto de TLR4 en la respuesta de los neutrófilos infiltrados. A. Infiltración de neutrófilos, determinado a las 48 h tras la oclusión de la ACM, por citometría de flujo (ver apartado Materiales y Métodos). **B.** Normalización del número de neutrófilos por el volumen de infarto en mm³, en animales isquémicos de ambos grupos. Datos representados como la media \pm SEM. (n=4-8; *P<0.05 vs. Naive; &P<0.05 vs. MCAO TLR4^{+/+}). **C.** Imágenes representativas del análisis de citometría, con el software Summit, de los grupos con isquemia.

Finalmente, quisimos determinar si existía algún tipo de relación entre la magnitud de infiltración de neutrófilos y el volumen del infarto. Para ello, realizamos una correlación entre el número total de neutrófilos infiltrados en el infarto y el volumen de infarto (expresado como %), de cada uno de los animales en los grupos MCAO, tanto $TLR4^{+/+}$ como $TLR4^{-/-}$. Como se observa en la Figura A-B, tanto en los animales $TLR4^{+/+}$ como en los animales $TLR4^{-/-}$, la infiltración de neutrófilos se correlacionó de manera directa con el volumen de infarto, pero, mientras que en el grupo MCAO $TLR4^{+/+}$ la correlación fue positiva (a mayor volumen de infarto, mayor número de neutrófilos infiltrados) (Figura 52 A), en el grupo MCAO $TLR4^{-/-}$ la correlación fue negativa (a mayor volumen de infarto, menor número de neutrófilos infiltrados) (Figura 52 B). Estos datos sugieren un papel diferencial de los neutrófilos presentes en cada uno de los genotipos, $TLR4^{+/+}$ y $TLR4^{-/-}$.

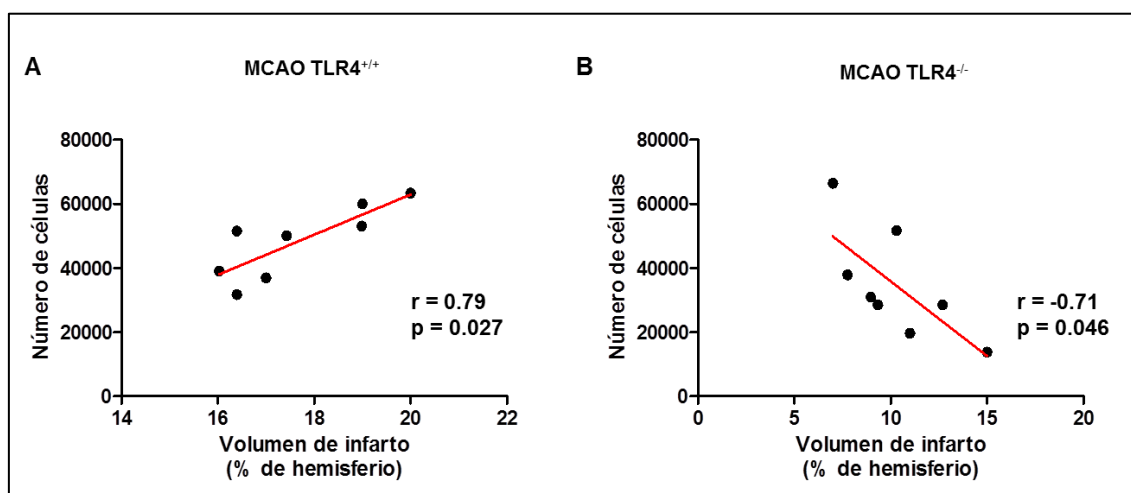


Figura 52. Correlación lineal entre infiltración de neutrófilos, determinado a las 48 h tras la oclusión de la ACM, por citometría de flujo y volumen de infarto determinado por IRM a las 24 h tras la isquemia. **A.** Grupo MCAO $TLR4^{+/+}$ ($n = 8$, r de Pearson = 0.79, $P = 0.027$). **B.** Grupo MCAO $TLR4^{-/-}$ ($n = 8$, r de Pearson = 0.71, $P = 0.046$).

2.1.3. La microglía residente

Además de estudiar las dos poblaciones más relevantes de células que se infiltran al parénquima isquémico, decidimos comprobar la respuesta de la microglía residente en estos grupos de animales. Como se ha explicado anteriormente, estas

células se caracterizan por niveles bajos del marcador CD45 y no son positivas al marcaje de CCR2 ni Ly6C.

Así, observamos un aumento significativo en el número de células de microglía tras las 48 horas de la oclusión de la ACM en los animales TLR4^{+/+} (Figura 53 A-B; P<0.05), pero no en los animales TLR4^{-/-} (Figura 53 A-B). Además, nuestros datos mostraron un aumento en el caso de los animales isquémicos TLR4^{+/+} en comparación con el grupo TLR4^{-/-} (Figura 53 A-B; P<0.05).

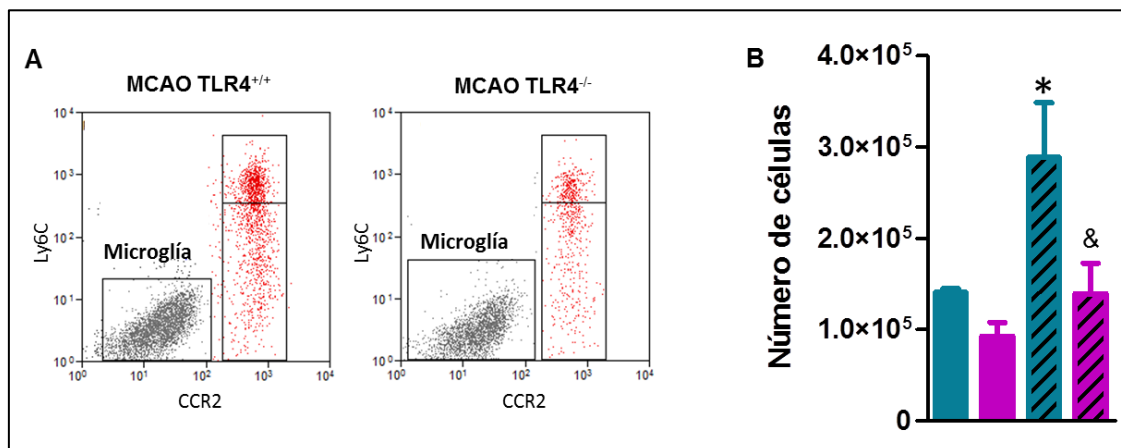


Figura 53. Efecto de TLR4 en la respuesta de la microglía. **A.** Imágenes representativas del análisis de citometría, con el software Summit, de los grupos con isquemia. **B.** Marcaje de microglía, determinado a las 48 h tras la oclusión de la ACM, por citometría de flujo (ver apartado Materiales y Métodos). Datos representados como la media \pm SEM. (n=4-8; *P<0.05 vs. Naive; & P<0.05 vs. MCAO TLR4^{+/+}).

2.2. EFECTO DE TLR4 EN LA RESPUESTA CIRCULANTE PERIFÉRICA

Procedimos a continuación a estudiar la población de leucocitos de la circulación sistémica con el fin de encontrar pistas que arrojaran luz sobre el comportamiento de las células que se infiltran en el tejido lesionado.

2.2.1. Monocitos circulantes

En el caso de los monocitos Ly6C^{hi}, los estudios de citometría pusieron de manifiesto una población de características heterogéneas, registrándose valores que mostraron una alta variabilidad entre los animales del mismo grupo. Además, no observamos ninguna diferencia dependiente de TLR4 en el tiempo estudiado, 48 horas de la oclusión (Figura 54).

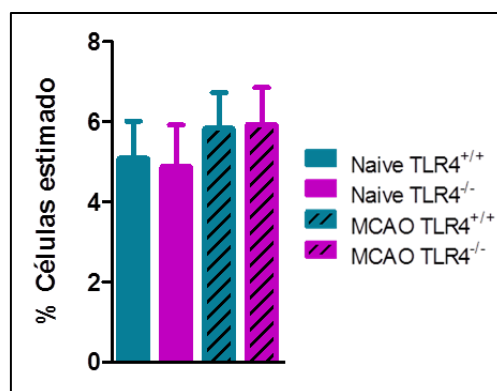


Figura 54. Efecto de TLR4 en la respuesta de los monocitos circulantes. Los niveles de monocitos circulantes se determinaron por citometría de flujo (ver apartado Materiales y Métodos) 2 días tras isquemia en los grupos representados. Datos representados como la media \pm SEM. (n=4-8).

2.2.2. Neutrófilos circulantes

Cuarenta y ocho horas después de la oclusión, se observó un incremento en el número total de neutrófilos en la sangre periférica, determinados por citometría de flujo, en comparación con los animales controles de ambos grupos. Además, la población de neutrófilos en los animales isquémicos TLR4^{+/+} mostró un incremento significativo en comparación con los animales isquémicos TLR4^{-/-} (Figura 55 A-B), que podría estar relacionada con su mayor infiltración en el parénquima cerebral.

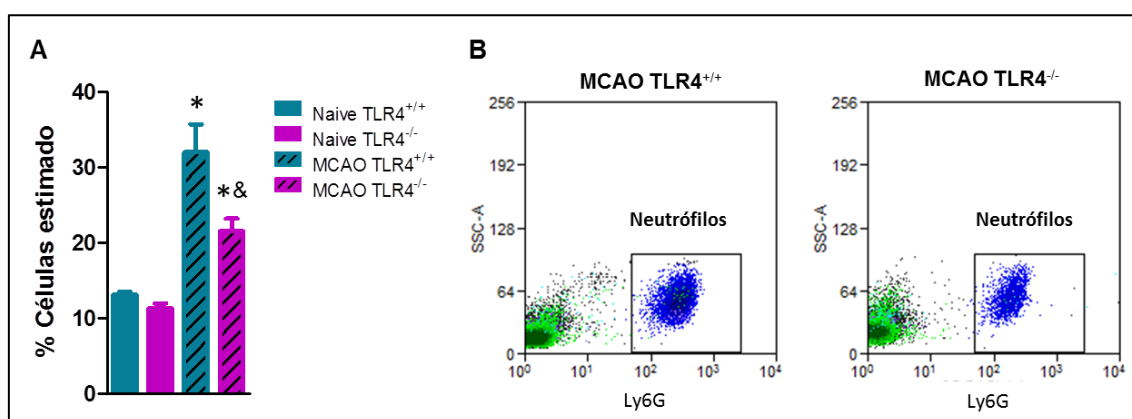


Figura 55. Efecto de TLR4 en la respuesta de los neutrófilos circulantes. A. Los niveles de neutrófilos circulantes se determinaron por citometría de flujo a las 48 h tras la oclusión de la ACM (ver apartado Materiales y Métodos). Datos representados como la media \pm SEM. (n=4-8; *P<0.05 vs. naive; &P<0.05 vs. MCAO TLR4^{+/+}). **B.** Imágenes representativas del análisis de citometría, con el software Summit, de los grupos con isquemia.

2.2.3. Linfocitos circulantes

En lo que se refiere a los linfocitos circulantes, nuestros datos mostraron, en el caso de las células T, un aumento significativo en su porcentaje en los animales naïve TLR4^{+/+} con respecto a los TLR4^{-/-}. La isquemia, por su parte, redujo significativamente el porcentaje de estas células en la sangre del grupo TLR4^{+/+}, pero no en el grupo TLR4^{-/-}. Existen, además, diferencias significativas en la población de células T tras la isquemia, ya que los animales TLR4^{+/+} presentan un número significativamente mayor en comparación con los animales TLR4^{-/-} (Figura 56 A; P<0.05).

En el caso de las células B, no se observaron diferencias significativas tras 48 h de la isquemia en los grupos analizados frente a sus respectivos naïve; sin embargo, la presencia del receptor TLR4 se asoció a una disminución significativa del número de células B en sangre tanto en condiciones basales como tras la oclusión isquémica (Figura 56 B; P<0.05).

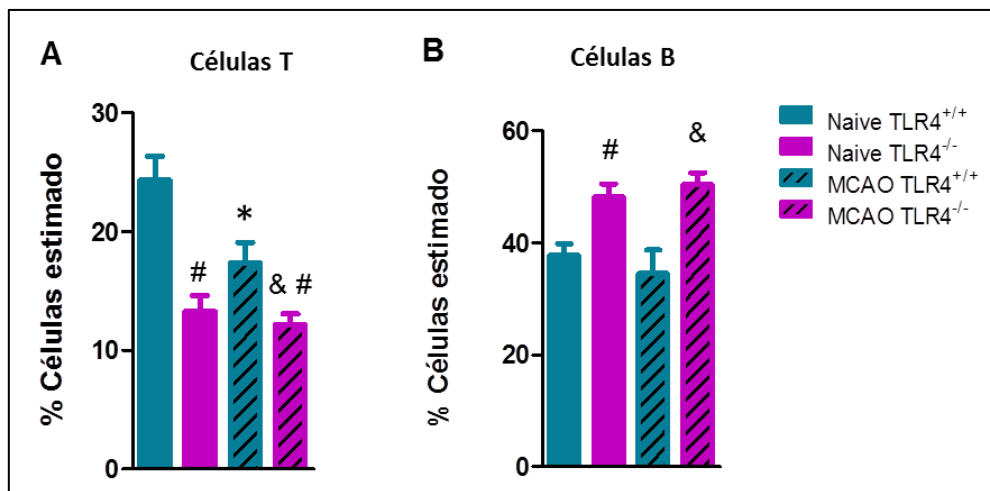


Figura 56. Efecto de TLR4 en la respuesta de los linfocitos circulantes. A. Niveles de células T circulantes determinados por citometría de flujo a las 48 h tras la oclusión de la ACM (ver apartado Materiales y Métodos). **B.** Niveles de células B circulantes determinados por citometría de flujo a las 48 h tras la oclusión de la ACM (ver apartado Materiales y Métodos). Datos representados como la media \pm SEM. (n=4-8; *P<0.05 vs. Naïve; # P<0.05 vs. Naïve TLR4^{+/+}; &P<0.05 vs. MCAO TLR4^{+/+}).

2.3. EFECTO DE TLR4 EN LA MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS DE LA MÉDULA ÓSEA TRAS ISQUEMIA

2.3.1. Monocitos de la médula ósea

Cuando se analizó la población de monocitos de la médula ósea se observaron diferencias significativas tanto en los animales TLR4^{+/+} como en los TLR4^{-/-}, comparando con sus controles naïve (Figura 57 A-B). Sin embargo, los datos no mostraron diferencias significativas dependientes del receptor TLR4 en la población de monocitos de la médula ósea (Figura 57 A).

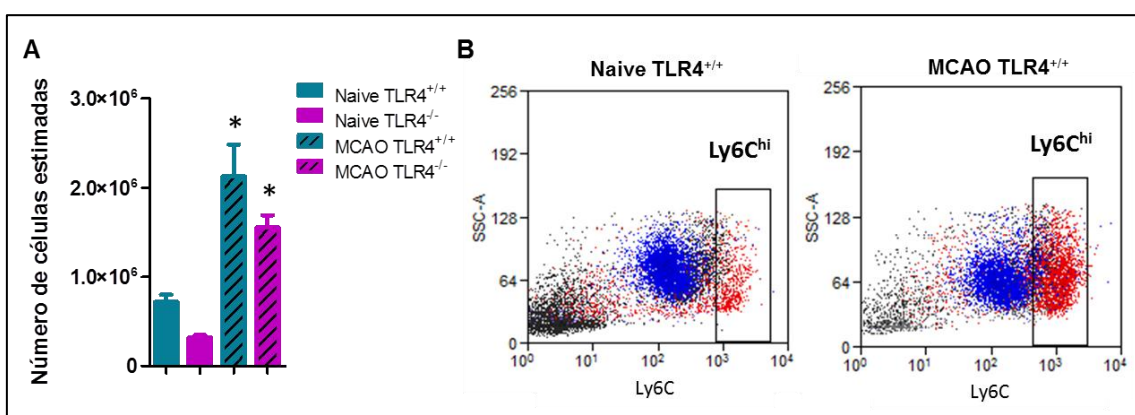


Figura 57. Efecto de TLR4 en la población de monocitos de la médula ósea. **A.** Los niveles de monocitos de la médula ósea fueron determinados por citometría de flujo a las 48 h tras la oclusión de la ACM (ver apartado Materiales y Métodos). Datos representados como la media \pm SEM. (n=4-8; *P<0.05 vs. Naïve). **B.** Imágenes representativas del análisis de citometría, con el software Summit, de los animales naïve TLR4^{+/+} y MCAO TLR4^{+/+}.

2.3.2. Neutrófilos de la médula ósea

De acuerdo con los resultados anteriores, tras las 48 horas de la oclusión, la exposición al daño isquémico en ambos grupos disminuyó el número total de neutrófilos en la médula ósea en comparación con los animales control (Figura 58 A-B), sin diferencias significativas entre los ratones TLR4^{+/+} y MCAO TLR4^{-/-} (Figura 58 A), lo que sugiere que la isquemia aumenta la movilización general de neutrófilos de la médula ósea de una manera independiente de TLR4.

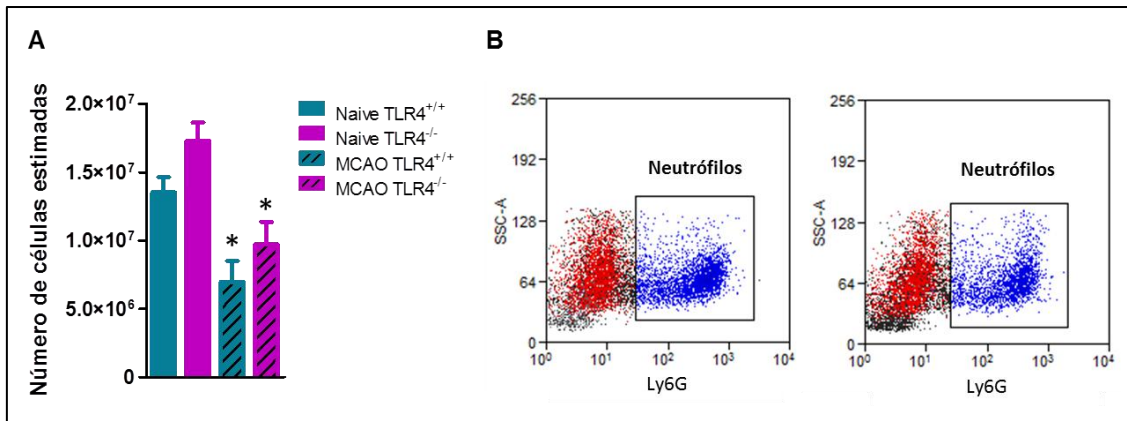


Figura 58. Efecto de TLR4 en la población de neutrófilos de la médula ósea. **A.** Los niveles de neutrófilos de la médula ósea fueron determinados por citometría de flujo a las 48 h tras la oclusión de la ACM (ver apartado Materiales y Métodos). Datos representados como la media \pm SEM. (n=4-8; *P<0.05 vs. Naive). **B.** Imágenes representativas del análisis de citometría, con el software Summit, de los animales naive TLR4^{-/-} y MCAO TLR4^{-/-}.

2.3.3. Linfocitos de la médula ósea

El análisis de las poblaciones de células T y células B no mostró cambios significativos debidos al receptor ni a la propia isquemia (Figura 59 A-B).

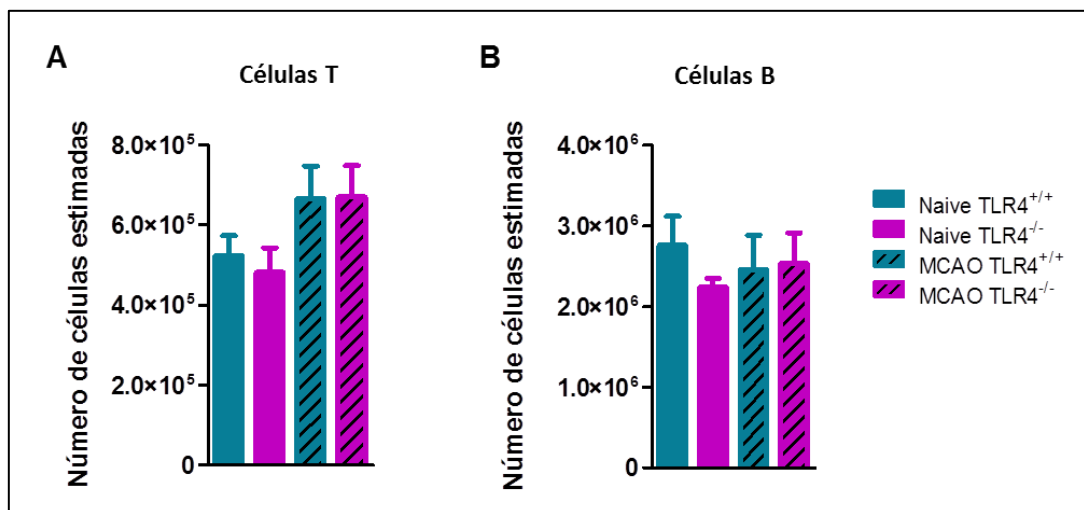


Figura 59. Efecto de TLR4 en la respuesta de los linfocitos de la médula ósea. **A.** Niveles de células T de la médula ósea determinados por citometría de flujo a las 48 h tras la oclusión de la ACM (ver apartado Materiales y Métodos). **B.** Niveles de células B de la médula ósea determinados por citometría de flujo a las 48 h tras la oclusión de la ACM (ver apartado Materiales y Métodos). Datos representados como la media \pm SEM. (n=4-8).

2.4. EFECTO DE TLR4 EN LA INFILTRACIÓN DE NEUTRÓFILOS

Dados los resultados obtenidos previamente mediante citometría de flujo, decidimos ahondar en el papel del neutrófilo en ausencia de TLR4. Para ello, decidimos comprobar los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia y la posterior cuantificación estereológica de los neutrófilos infiltrados. Para estos estudios se utilizó el mismo modelo experimental que para la infiltración de células del apartado anterior (3.2.1 de Materiales y Métodos).

La ausencia del receptor TLR4 en los ratones $TLR4^{-/-}$ se asoció a un menor volumen de infarto 48 horas después de MCAO (Figura 60 A; $P < 0,05$; $n=8$), como ya se había demostrado previamente (Caso et al., 2007). De nuevo, la neuroprotección debida a la ausencia de este receptor fue concomitante con un aumento en el número de neutrófilos en el área infartada (core), como lo demuestra un mayor número de células NIMP-R14⁺ por mm³ a las 48 horas (Figura 60 B; $P < 0.05$) tras la isquemia. Este aumento de neutrófilos en el parénquima confirma los resultados observados después de la disociación del tejido cerebral y la citometría de flujo con un número elevado en células CD11b⁺Ly6G⁺ en los animales $TLR4^{-/-}$.

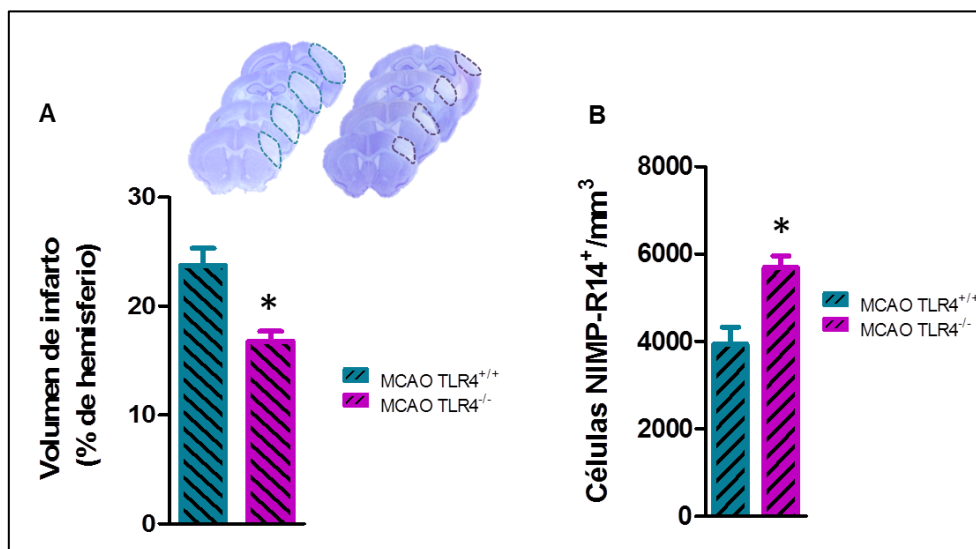


Figura 60. Efecto de TLR4 en el volumen de infarto y en la población de neutrófilos infiltrados tras isquemia. A. Representación gráfica de los tamaños de infarto entre los animales $TLR4^{+/+}$ con MCAO (C57BL/10J: $TLR4^{+/+}$) y los ratones $TLR4^{-/-}$ con MCAO (C57BL/10ScNJ: $TLR4^{-/-}$) medidos por Nissl a las 48 horas de la oclusión. **B.** Cuantificación de la infiltración de neutrófilos, realizada mediante muestreo de células NIMP-R14⁺, en 6 secciones coronales (técnica de fraccionador óptico) y expresada normalizada por el volumen de infarto. Datos representados como la media \pm SEM. ($n=5-9$; $*P < 0.05$ vs. MCAO $TLR4^{+/+}$).

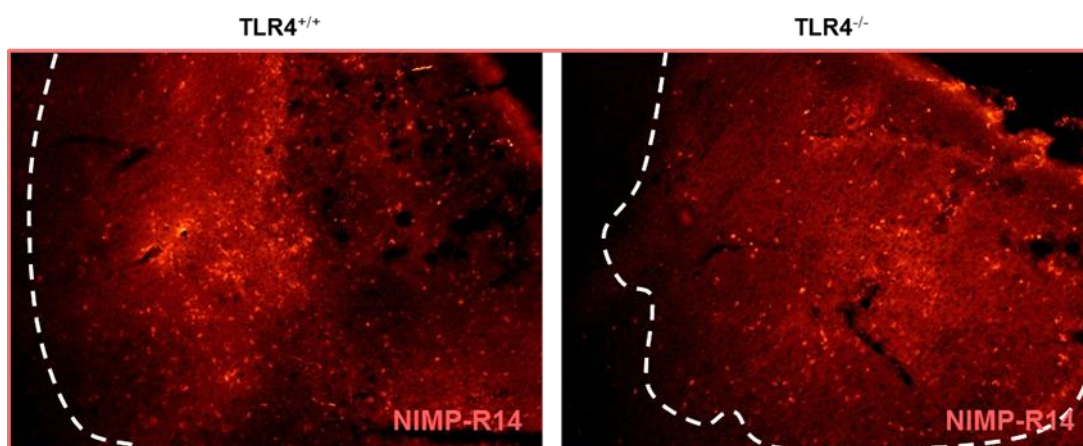


Figura 61. Neutrófilos infiltrados tras la isquemia. Imágenes representativas de las células NIMP-R14⁺ (neutrófilos) infiltradas en el núcleo isquémico 48 horas tras isquemia en ratones TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-}.

Además, los estudios de doble inmunofluorescencia del marcador NIMP-R14 con el anticuerpo laminina, 48 horas después de la isquemia, mostraron que la mayoría de los neutrófilos se encontraban infiltrados en el parénquima cerebral (Figura 62), al igual que se ha observado anteriormente (Cuartero et al., 2013), y no dentro del lumen de los vasos sanguíneos como se ha descrito en el modelo de isquemia transitorio (Enzmann et al., 2013).

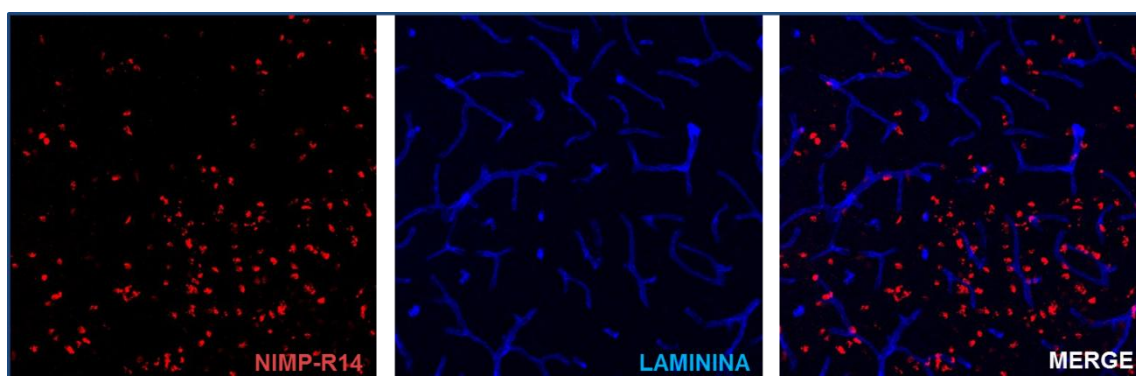


Figura 62. Doble inmunofluorescencia de NIMP-R14 (neutrófilos) y laminina (vasos). Imágenes representativas de los neutrófilos en el parénquima cerebral (core) tomadas con un objetivo 20X.

Por otro lado, quisimos corroborar si existía correlación en ambos grupos entre el número de neutrófilos infiltrados y el volumen de infarto. Tras realizar el análisis, se observó una tendencia a la correlación positiva en los animales MCAO

TLR4^{+/+} (Figura 63 A), mientras que en el grupo de grupo MCAO TLR4^{-/-}, nuevamente, la correlación fue negativa (Figura 63 B).

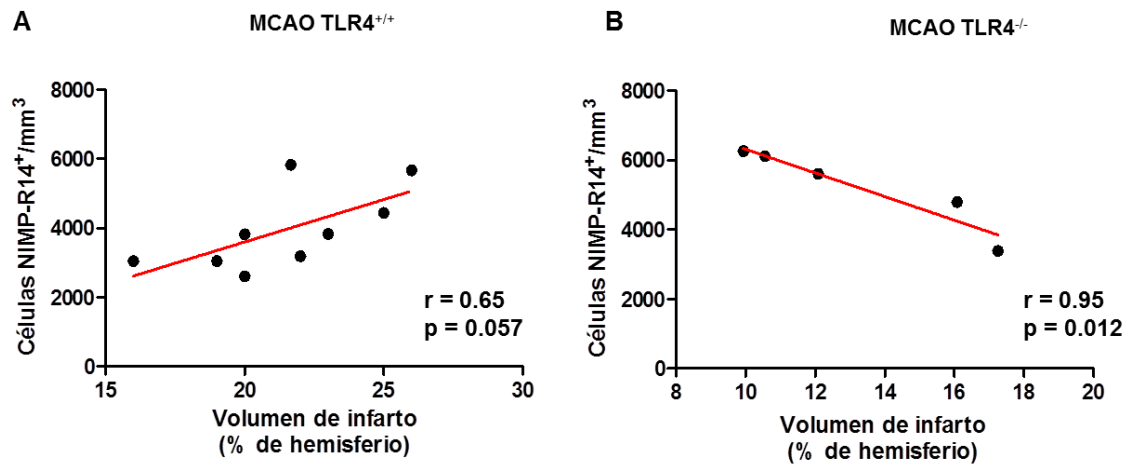


Figura 63. Correlación lineal entre infiltración de neutrófilos, determinada a las 48 h tras la oclusión de la ACM por estudio estereológico, y volumen de infarto determinado por IRM a las 24 h tras la isquemia. **A.** Grupo MCAO TLR4^{+/+} (n = 9, r de Pearson = 0.65, P = 0.057). **B.** Grupo MCAO TLR4^{-/-} (n = 5, r de Pearson = 0.95, P = 0.012).

2.5. EFECTO DE TLR4 EN EL VOLUMEN DE INFARTO TRAS LA ELIMINACIÓN DE NEUTRÓFILOS

Los resultados anteriores sugieren un papel diferencial del neutrófilo dependiendo de la presencia o ausencia de TLR4. Por ello, para determinar si el aumento de la infiltración de los neutrófilos en el núcleo isquémico observado en ausencia del receptor TLR4 está implicado en el desarrollo de la lesión, se determinó el volumen de infarto tras la eliminación de forma específica de la población periférica de estas células *in vivo*, tal y como se explica en el punto 3.2.2. Materiales y Métodos (Figura).

Del mismo modo que se ha observado en otros estudios (Daley et al., 2008), tal tratamiento causó una reducción en los neutrófilos circulantes (Figura 64 B). De acuerdo con el papel deletéreo de los neutrófilos en la isquemia cerebral (Jin et al., 2010a; Kriz, 2006; Segel et al., 2011; Yilmaz and Granger, 2008), el volumen de infarto en ratones TLR4^{+/+} tratados con el anticuerpo leucocitario anti-Ly6G fue significativamente inferior al encontrado en el grupo tratado con isotipo IgG (Figura

64 A; $P < 0.05$, $n = 6$). Pero más interesante fue la observación de que, por el contrario, el grupo de animales $TLR4^{-/-}$ a los que se les eliminó los neutrófilos presentaron un volumen de infarto significativamente mayor que el mismo tipo de animales tratados con el anticuerpo isotipo control (Figura 64 A; $P > 0.05$, $n = 5$).

Por tanto, estos resultados apoyan la idea del papel diferencial del neutrófilo en la isquemia cerebral según la expresión o no de $TLR4$, sugiriendo que, en su ausencia, el neutrófilo presenta un fenotipo menos dañino o incluso participa activamente en la neuroprotección.

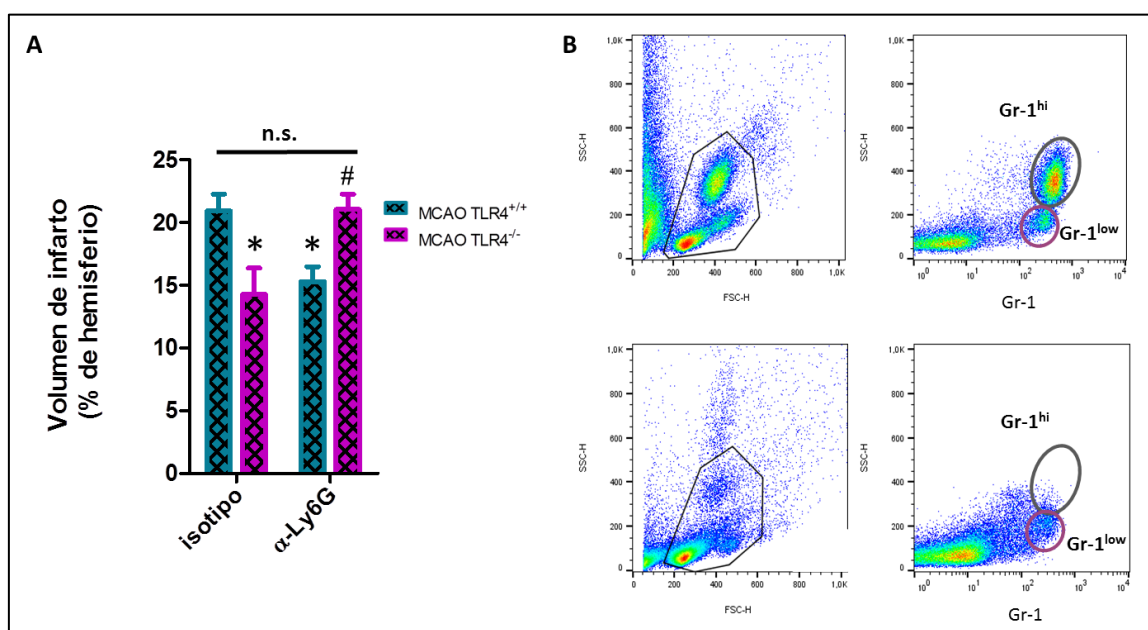


Figura 64. Efecto del anticuerpo anti-Ly6G en el volumen de infarto de ratones MCAO $TLR4^{+/+}$ y MCAO $TLR4^{-/-}$. **A.** Volúmenes de infarto de los diferentes genotipos con su tratamiento ($n=5-6$; * $P < 0.05$ vs. MCAO $TLR4^{+/+}$ isotipo; & $P < 0.05$ vs. MCAO $TLR4^{-/-}$ isotipo). **B.** Muestra de sangre de animales tratados con anticuerpo isotipo (superior) y con anti-Ly6G (inferior). Población de neutrófilos caracterizada como $Gr-1^{+}$ y $CD11b^{+}$.

Decidimos a continuación analizar si el efecto en el tamaño de la lesión en ambos genotipos se reflejaba en un correlato funcional, manifestado en distinta gravedad en los déficits neurológicos en los animales de ambos grupos. Para ello realizamos el test de la huella, y analizamos dos patrones de marcha diferentes: la distancia entre las patas delanteras y la distancia entre las patas traseras.

El análisis del patrón de marcha de la distancia entre las patas delanteras, no mostró diferencias significativas entre $TLR4^{+/+}$ y $TLR4^{-/-}$, con eliminación o no de la

población de neutrófilos (Figura 65 A). Sin embargo, el patrón de marcha de la distancia entre las patas traseras detectó déficits significativos en el grupo $TLR4^{+/+}$ tratado con isotipo, 48 h después del MCAO, frente a su medida basal (Figura 65 B; $P < 0.05$). Además, los ratones $TLR4^{-/-}$ también presentaron diferencias significativas 24 horas tras la eliminación de neutrófilos con respecto al grupo $TLR4^{+/+}$, detectándose de nuevo un aumento de la distancia entre las patas traseras (Figura 65 B; $P < 0.05$).

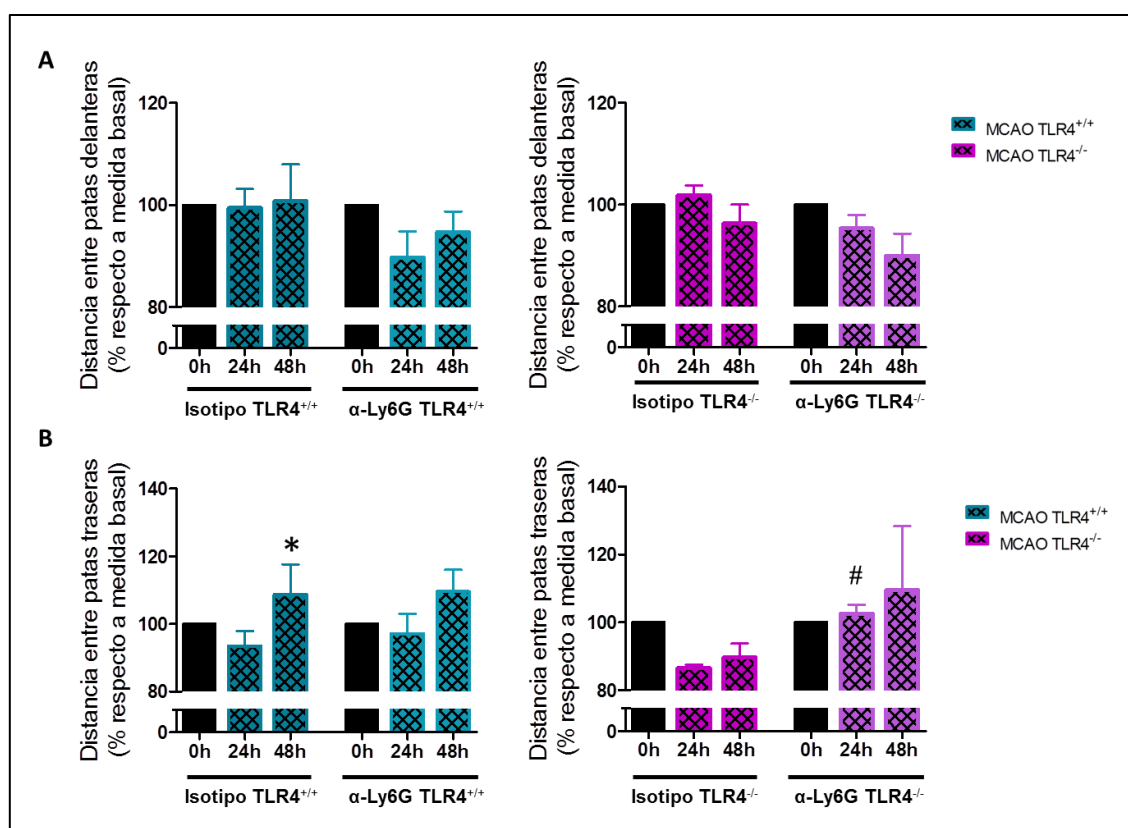


Figura 65. Test de la huella tras MCAO y eliminación de neutrófilos. Cuantificación del patrón de marcha 24 h y 48 h, tras la cirugía ratones $TLR4^{+/+}$ y $TLR4^{-/-}$. Todos los datos se expresan como porcentaje de cada valor basal. **A.** Distancia entre las patas delanteras, medida en cm después de MCAO. **B.** Distancia entre las patas traseras, medida en cm de después de MCAO. Los datos son media \pm SEM ($n = 5-6$; * $P < 0.05$ vs basal; # $P < 0.05$ vs α -Ly6G $TLR4^{+/+}$).

2.6. EFECTO DEL RECEPTOR $TLR4$ EN EL FENOTIPO DE NEUTRÓFILOS TRAS ISQUEMIA

Para los estudios de polarización se utilizó el modelo experimental explicado en el punto 3.2.1 de Materiales y Métodos.

Puesto que el marcador Ym1, proteína Chil3, se considera un referente en la polarización de los macrófagos M2 (activación alternativa) en el ratón (Mosser and Edwards, 2008), y nuestro grupo fue pionero en describir que una población de neutrófilos, a la que denominamos N2, eran capaces de expresarlo cuando se trataban con el agonista de PPAR γ , rosiglitazona, tras isquemia (Cuartero et al., 2013), seleccionamos este marcador para explorar si la presencia del receptor TLR4 afectaba de la misma manera las proporciones relativas de los neutrófilos activados clásicamente y las poblaciones de neutrófilos N2 en el cerebro isquémico. Para ello, cuantificamos estereológicamente el número de neutrófilos N2 como células Ym1⁺, NIMP-R14⁺ en el núcleo isquémico 48 horas después de MCAO, en ratones TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} (Figura 66). Así, a las 48 horas, encontramos que el 76% de los neutrófilos NIMP-R14⁺ en las secciones cerebrales fueron Ym1- en el grupo TLR4^{+/+}, en contraste con el grupo TLR4^{-/-}, en el que el 48% de los neutrófilos eran N2 (Ym1⁺). Además, el número absoluto de neutrófilos N2 (Ym1⁺), determinado como número de células por milímetro cúbico (Figura 66 A; P<0.05, n=4-6), fue notablemente mayor en los animales TLR4^{-/-}.

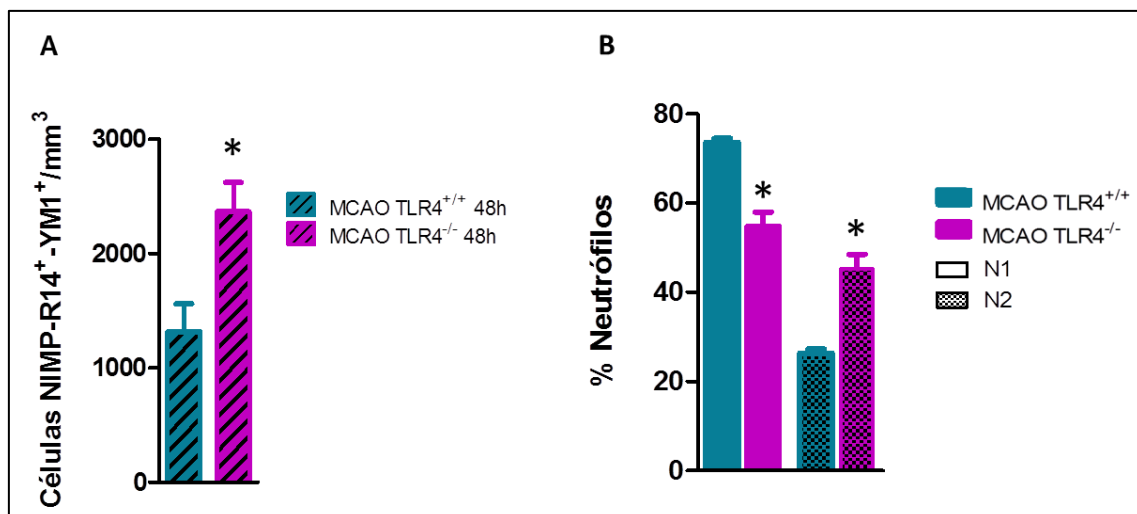


Figura 66. Efecto de la ausencia de TLR4 sobre el fenotipo de los neutrófilos. A. Cuantificación de neutrófilos N2, realizada mediante muestreo de células Ym1⁺/NIMP-R14⁺ en 6 secciones coronales (técnica de fraccionador óptico) y expresada normalizada por el volumen de infarto. Datos representados como la media \pm SEM. (n=4-6; *P<0.05 vs. MCAO TLR4^{+/+} 48h). **B.** Gráfico del porcentaje de neutrófilos que expresan el marcador M2 Ym1 (barras con puntos) 48 horas después de MCAO en animales TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} (*P<0.05 vs. MCAO TLR4^{+/+}).

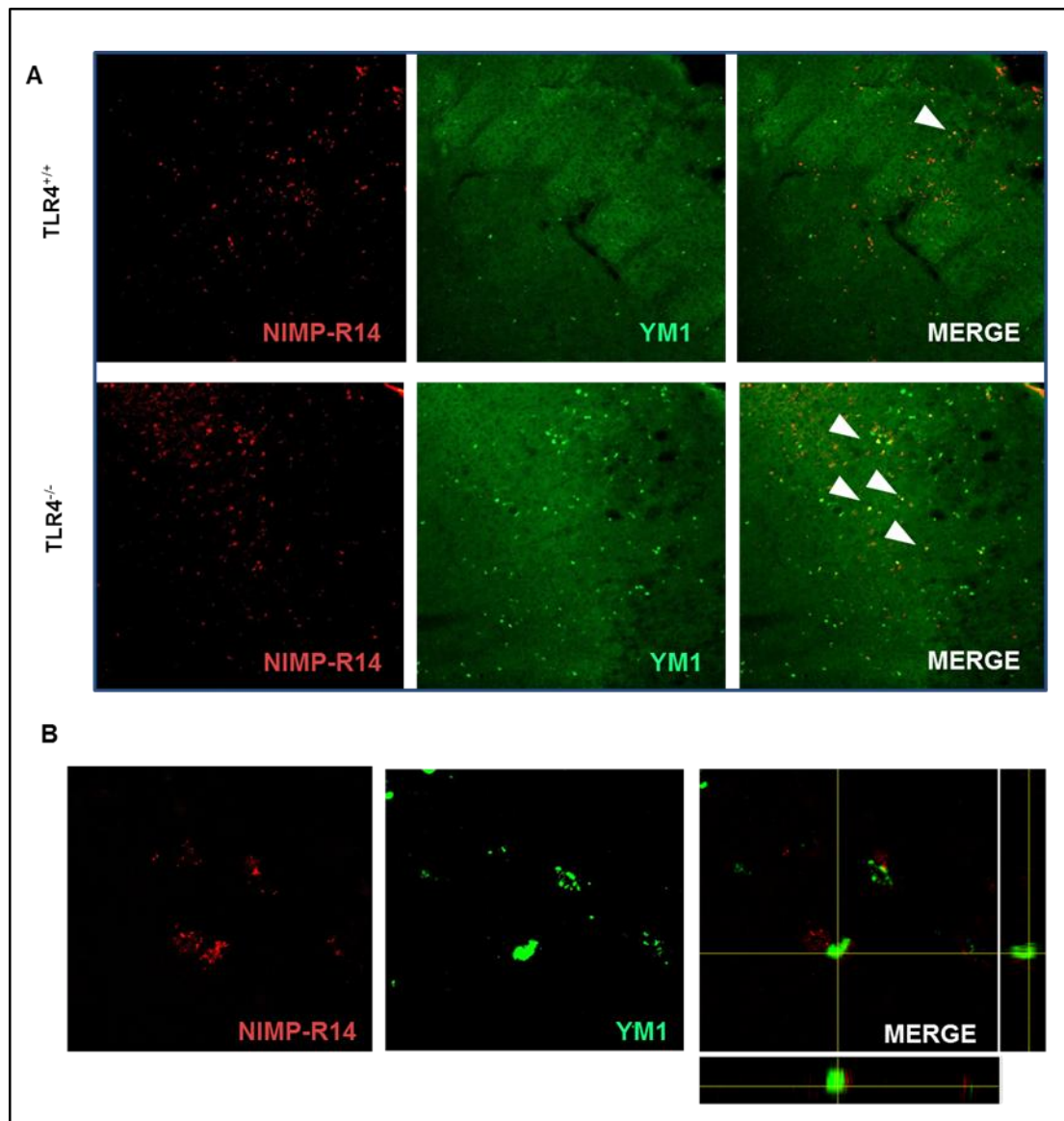


Figura 67. Doble inmunofluorescencia de NIMP-R14 (neutrófilos) e YM1 (fenotipo N2). A. Imágenes representativas de los neutrófilos en el parénquima cerebral (core) tomadas con un objetivo 10X. Con flechas blancas se señalan los neutrófilos N2. B. Proyección ortogonal de la colocalización de NIMP-R14⁺ (neutrófilos, rojo) e YM1⁺ (verde) con un objetivo 40X.

Estos valores se confirmaron a las 48 horas después de la MCAO por cuantificación de la citometría de flujo de células Ly6G⁺ Ym1⁺ infiltradas (Figura 68), donde se observó una tendencia hacia un mayor número de neutrófilos YM1 en los animales MCAO TLR4^{-/-} cuando se cuantificó el número total de células, y un valor significativamente superior al de los animales TLR4^{+/+} al normalizar por el volumen de infarto (neutrófilos Ym1⁺ / mm³; Figura 68 B; P<0.05). Estos resultados indican

que la ausencia del receptor TLR4 aumenta el número de neutrófilos N2 en el cerebro isquémico.

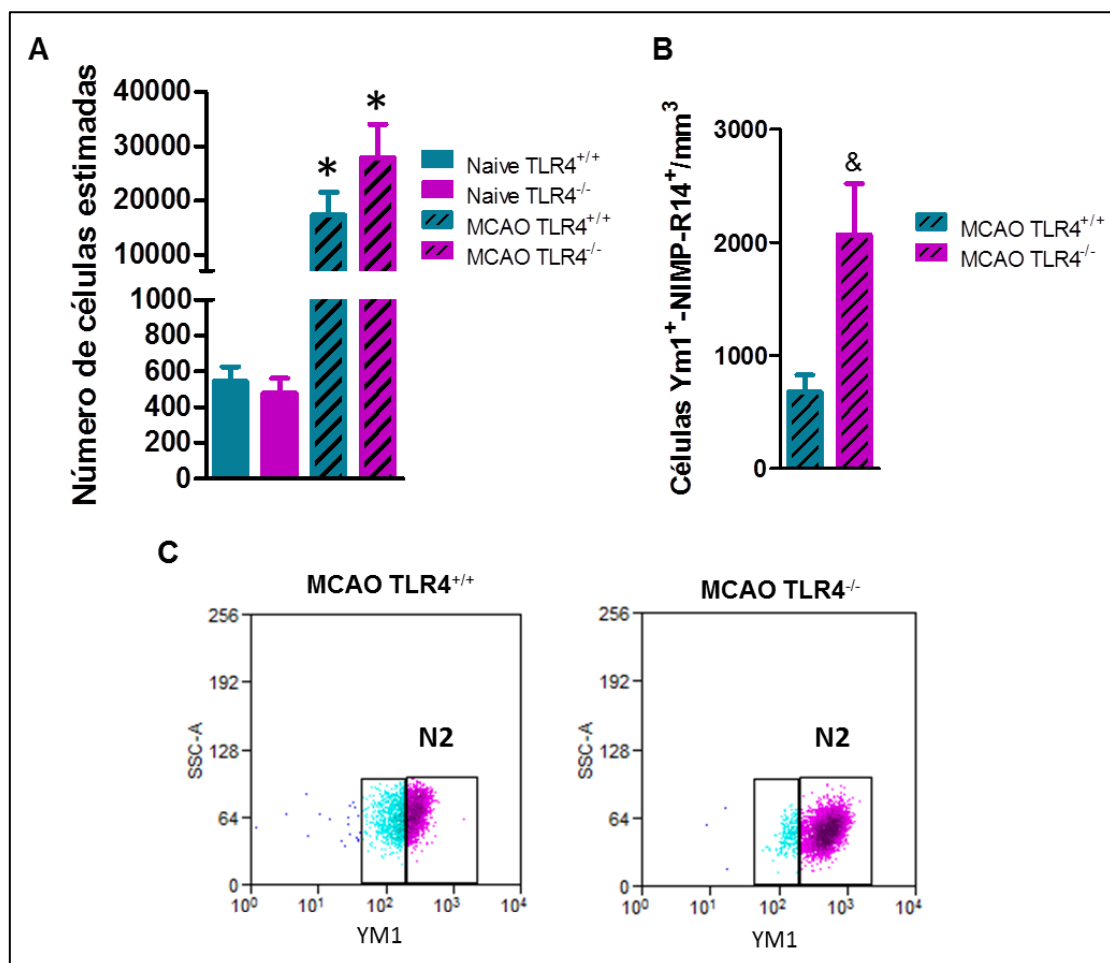


Figura 68. Efecto de TLR4 en la población de neutrófilos N2 infiltrados en cerebro.

A. Número total estimado de neutrófilos positivos a YM1 determinados por citometría de flujo a las 48 h tras la oclusión de la ACM (ver apartado Materiales y Métodos). **B.** Normalización del número de neutrófilos por el volumen de infarto en mm³, en animales isquémicos de ambos grupos. Datos representados como la media \pm SEM. (n=4-6; *P<0.05 vs. naïve; &P<0.05 vs. MCAO TLR4^{+/+}). **C.** Imágenes representativas del análisis de citometría, con el software Summit, de los animales naïve TLR4^{+/+} y MCAO TLR4^{-/-}.

Por último, decidimos estudiar el fenotipo de los neutrófilos circulantes en sangre en ambos genotipos tras 48 horas de la isquemia. De acuerdo con los resultados en cerebro, los datos mostraron un aumento significativo en el porcentaje de neutrófilos YM1⁺ 48 tras isquemia en el grupo de animales TLR4^{-/-} (Figura 69; P<0.05). En el caso de los neutrófilos N1, por el contrario, no se apreciaron diferencias significativas (P>0.05).

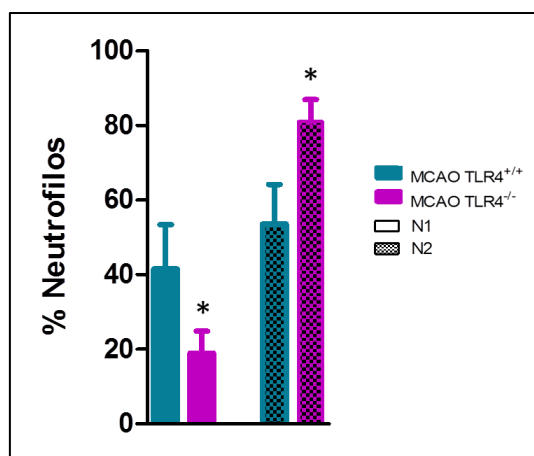


Figura 69. Efecto de TLR4 en el fenotipo de los neutrófilos de la sangre. Los niveles de neutrófilos YM1⁺ se determinaron por citometría de flujo a las 48 h tras la oclusión de la ACM (ver apartado Materiales y Métodos). Datos representados como la media \pm SEM. (n=4-6; *P<0.05 vs. TLR4^{+/+}).

2.7. PAPEL DEL RECEPTOR TLR4 DE PLAQUETAS Y CÉLULAS MIELOIDES TRAS ISQUEMIA

Puesto que la infiltración de los neutrófilos, en gran parte, es dependiente de su interacción con la plaqueta activada en el momento agudo tras isquemia (Sreeramkumar et al., 2014), y diferentes estudios han demostrado que TLR4 juega un papel importante en la activación plaquetaria (Cognasse et al., 2015), decidimos comprobar si la mayor infiltración en los animales TLR4^{-/-} y su resultado en la lesión eran dependientes de la ausencia del receptor en la plaqueta y/o en el propio neutrófilo.

En primer lugar, con el fin de determinar si la presencia de este receptor en estos tipos celulares está implicada diferencialmente en el desarrollo de la lesión, se determinó el volumen de infarto tras isquemia. Los resultados muestran que la ausencia del receptor TLR4 en plaquetas (TLR4^{loxP/Pf4-cre}) no afectó al volumen de infarto (Figura 70 A). Sin embargo, su ausencia en neutrófilos (TLR4^{loxP/Lys-cre}; linaje mieloide) disminuyó significativamente el volumen de infarto, en comparación con sus controles respectivos (Figura 70 B; P < 0.05).

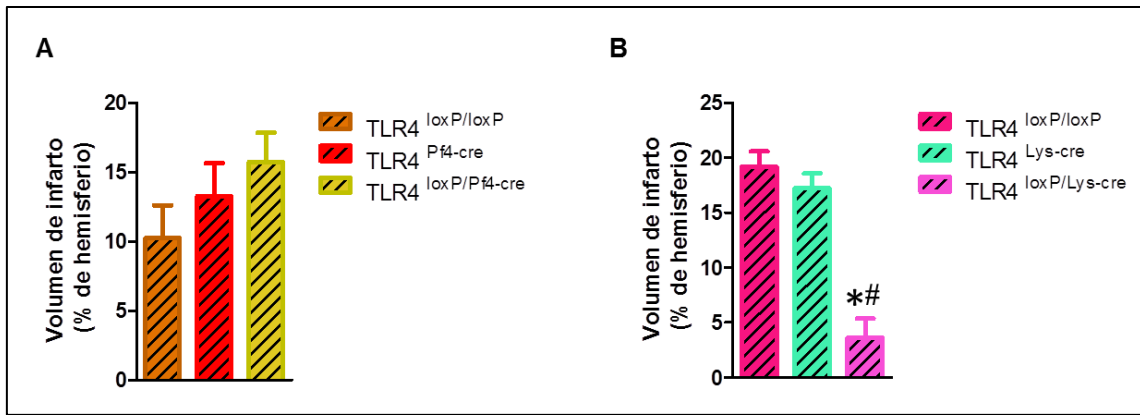


Figura 70. Efecto sobre el volumen del infarto de la ausencia de TLR4 en diferentes tipos celulares. **A.** Representación gráfica de los tamaños de infarto entre los animales TLR4^{loxP/loxP}, TLR4^{Pf4-cre} y TLR4^{loxP/Pf4-cre} (KO TLR4 plaquetario) tras oclusión de la ACM, medidos por IRM a las 24 horas de la oclusión. **B.** Representación gráfica de los tamaños de infarto de los animales TLR4^{loxP/loxP}, TLR4^{Lys-cre} y TLR4^{loxP/Lys-cre} (KO TLR4 neutrófilo o linaje mieloide) tras oclusión de la ACM, medidos por IRM a las 24 horas de la oclusión. Datos representados como la media \pm SEM. (n=5-9; *P<0.05 vs. MCAO TLR4^{loxP/loxP}; # P<0.05 vs. MCAO TLR4^{Lys-cre}).

Realizamos un curso temporal, mediante citometría de flujo de muestras sanguíneas para cuantificar el número de neutrófilos que presentaba estos ratones transgénicos de la línea de células mieloides. En la toma basal no se observaron diferencias significativas en el número de neutrófilos en cada genotipo, esto quiere decir, que la eliminación de TLR4 en linaje mieloide no produce neutropenia (Figura 71).

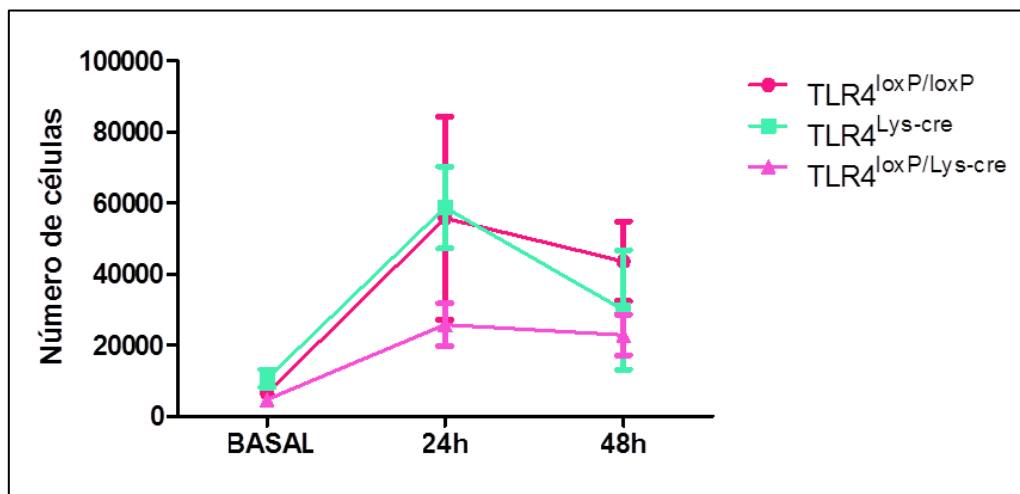


Figura 71. Curso temporal del número de neutrófilos en sangre. Representación gráfica de los neutrófilos totales en sangre de cada grupo experimental utilizado para observar el papel del TLR4 de neutrófilos (TLR4^{loxP/loxP}, TLR4^{Lys-cre} y TLR4^{loxP/Lys-cre}).

Seguidamente, decidimos comprobar el fenotipo de los neutrófilos en el parénquima cerebral 48 horas tras isquemia de los ratones que no presentan TLR4 en células mieloides. En este caso utilizamos como control el ratón $TLR4^{loxP/loxP}$. Los datos mostraron un aumento significativo en el porcentaje de neutrófilos $YM1^+$ o $N2$ en el grupo de animales $TLR4^{loxP/Lys-cre}$ (Figura 72; $P < 0.05$).

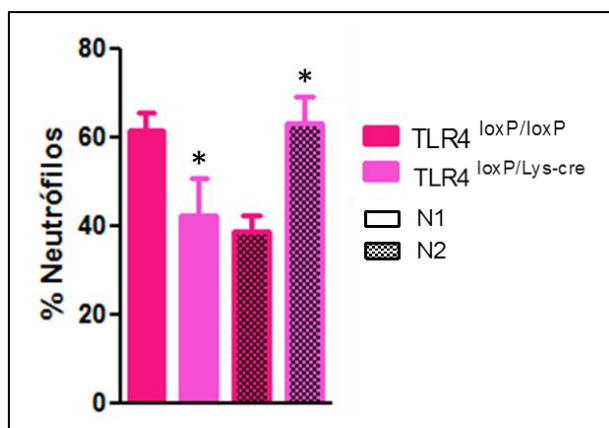


Figura 72. Efecto de la ausencia de TLR4 en células mieloides sobre el fenotipo de los neutrófilos. A. Gráfico del porcentaje de neutrófilos que expresan el marcador $M2 Ym1$ (barras con puntos) 48 horas después de MCAO en animales $TLR4^{loxP/loxP}$ y $TLR4^{loxP/Lys-cre}$. Datos representados como la media \pm SEM. (* $P < 0.05$ vs. MCAO $TLR4^{+/+}$).

2.8. CARACTERIZACIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS $N2$ EN ISQUEMIA EXPERIMENTAL

Para la caracterización genética de los neutrófilos con fenotipo $N2$ tras la isquemia experimental, se aislaron los neutrófilos de la sangre de ratones MCAO $TLR4^{+/+}$, como población de neutrófilos enriquecida en el fenotipo $N1$, y $TLR4^{-/-}$, como población de neutrófilos enriquecida en el fenotipo $N2$. Posteriormente se realizó la extracción de RNA y la hibridación de genes (ver apartado 2.1.5. de Materiales y Métodos).

Para determinar la pureza de las muestras, en concreto, que todas o la mayoría de las células aisladas fueran neutrófilos en ambos grupos, realizamos una búsqueda de marcadores específicos de neutrófilos o marcadores de otros leucocitos. Lo que observamos es que efectivamente, genes presentes únicamente en neutrófilo (*cxcr2*, *lyz2*, *cxcr4* y *ly6g*) tenían unos niveles de expresión muy altos

(Figura 73). Sin embargo, genes que se expresan en otras células leucocitarias (Ccr2 y Ly6C) presentaban niveles de expresión muy bajos (Figura 73).

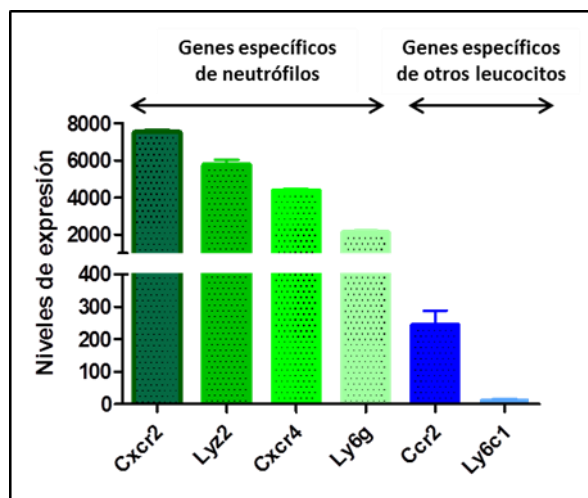


Figura 73. Niveles de expresión de genes específicos de neutrófilos vs. Otros leucocitos. Los genes seleccionados como específicos de neutrófilos son *cxcr2*, *lyz2*, *cxcr4* y *ly6g*, y los seleccionados como específicos de otras células leucocitarias son *ccr2* y *ly6c* (ambos se encuentran en los monocitos).

Inicialmente, llevamos a cabo un análisis de los seis transcriptomas de neutrófilos caracterizados en el experimento, utilizando la herramienta WebMeV (Multiple Experiment Viewer). Para ellos se realizó un filtrado previo de la expresión de los 100 genes que presentan una mayor variabilidad en expresión entre las distintas muestras, esto es, genes cuya expresión presenta una mayor desviación estándar, para posteriormente utilizar esta lista de genes y llevar a cabo un *clúster* jerárquico de las muestras de una manera no supervisada. Este método exploratorio de análisis de datos no evalúa ninguna hipótesis *a priori*, sino que se limita a agrupar los sujetos de estudio en función de su similitud, permitiendo agrupar nuestras muestras de una manera objetiva, sin tener en cuenta el fenotipo previo de las muestras estudiadas. Los resultados obtenidos muestran que los transcriptomas de los neutrófilos TLR4 WT y KO se agrupan en función del genotipo de cada tipo de muestra (neutrófilos TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-}) (Figura 74) indicando que la presencia o ausencia de TLR4 en los neutrófilos produce cambios en el perfil transcripcional de estas células.

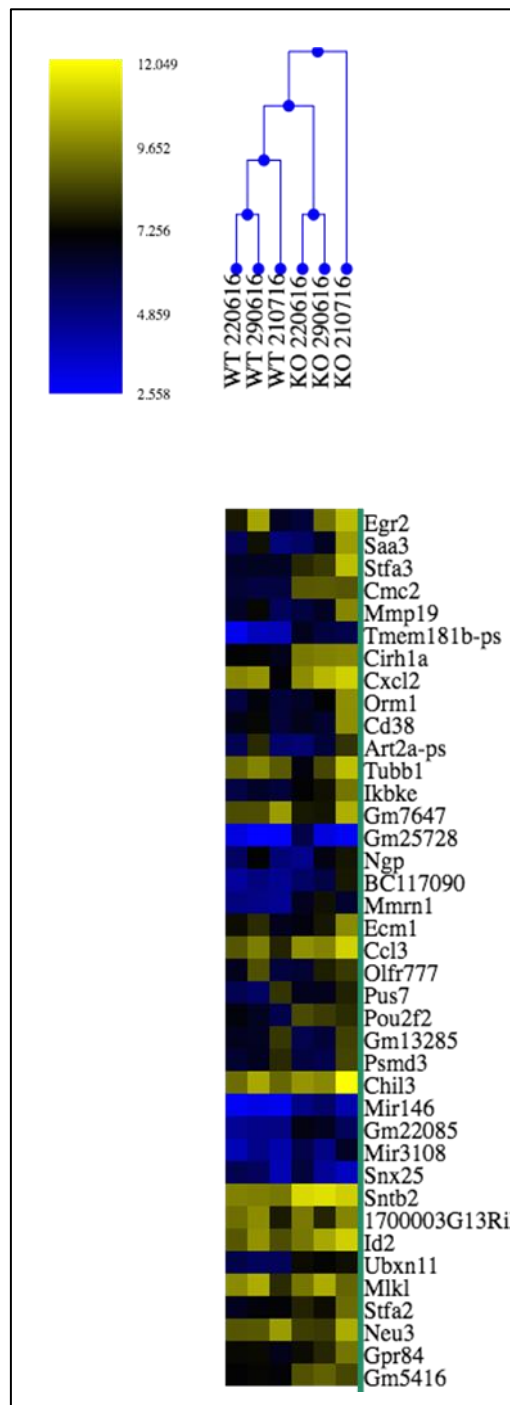


Figura 74. Clúster jerarquizado de neutrófilos $TLR4^{+/+}$ y $TLR4^{-/-}$. Realizado con 100 genes con el software de análisis MeV. El *heatmap* muestra los 20 genes que presentan una mayor desviación estándar. La lista completa de los genes empleada para realizar este análisis se encuentra recogida en el anexo 1.

Puesto que la combinación de estos 100 genes fue capaz de agrupar los neutrófilos en función de su genotipo, quisimos comprobar si existía una función asociada al conjunto de genes obtenido. Para ello realizamos análisis GO de esta lista de genes empleando la web DAVID y encontramos que 7 de estos genes (*ikbke*, *olfm4*, *snip1*, *saa3*, *per1*, *tnfaip3*, *ecm1* e *il1a*) se encontraban relacionados con la señalización I- κ Bkinase/NF- κ B (GO0007249) con un valor FDR significativo (FDR=0,034; P-valor=2,14E-05). Algunos de estos genes se encontraban más expresados en TLR4^{+/+}, donde es esperable ya que TLR4 está directamente asociado con la activación de esta ruta (Alvarez et al., 2006), y otros en TLR4^{-/-}, donde hipotetizamos que se está dando algún mecanismo compensatorio de la ruta. Estos resultados sugieren que la señalización por NF- κ B se ve alterada cuando se manipula la expresión de TLR4 en los neutrófilos. Los resultados del análisis GO no encontraron ninguna otra relación con un FDR<0.05.

A continuación, para llevar a cabo una caracterización más fina del perfil transcripcional de los genes que caracterizan a una u otra población de neutrófilos, llevamos a cabo el estudio de expresión diferencial de genes entre los neutrófilos TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-}. En este tipo de análisis agrupamos a los neutrófilos en función de su expresión de TLR4 (TLR4^{+/+} ó WT; n=3) vs. TLR4^{-/-} ó KO (n=3) y usamos tests estadísticos (paquete estadístico: limma) para determinar qué genes de interés se expresan diferencialmente en una u otra población (Tablas 7 y 8).

Gen	Ratio KO vs WT	Gen	Ratio KO vs WT
<i>Tlr4</i>	0,037	<i>Cd3g</i>	0,475
<i>Hpgd</i>	0,311	<i>Trim24</i>	0,485
<i>Eva1b</i>	0,348	<i>Tcrg-C2</i>	0,489
<i>Scrg1</i>	0,359	<i>Rps15a-ps6</i>	0,495
<i>Nipal3</i>	0,372	<i>Tns3</i>	0,496
<i>Nfia</i>	0,384	<i>Mir669p-1</i>	0,496
<i>Zmym1</i>	0,409	<i>Mir669p-1</i>	0,496
<i>Ldlrap1</i>	0,409	<i>Ada</i>	0,497
<i>Pttg1</i>	0,423		
<i>Snora70</i>	0,437		

Tabla 7. Tabla de los genes con valores más bajos del índice de inducción KO vs WT.
Ratio calculado como la diferencia de las medias en escala natural.

Gen	Ratio KO vs WT	Gen	Ratio KO vs WT	Gen	Ratio KO vs WT
<i>Stfa3</i>	8,816	<i>Stfa1</i>	2,819	<i>Dusp2</i>	2,099
<i>Cmc2</i>	6,903	<i>Nr4a1</i>	2,777	<i>Dpep2</i>	2,081
<i>Cirh1a</i>	6,205	<i>Anxa6</i>	2,742	<i>Pisd-ps2</i>	2,063
<i>Tmem181b-ps</i>	6,044	<i>Clec4a1</i>	2,516	<i>Fcgr2b</i>	2,036
<i>Saa3</i>	5,045	<i>Chil3</i>	2,482	<i>Cped1</i>	1,976
<i>Ikbke</i>	4,692	<i>Cxcl2</i>	2,427	<i>Ccl2</i>	1,972
<i>Orm1</i>	4,677	<i>Pisd-ps3</i>	2,360	<i>Atp1a1</i>	1,962
<i>Mmrn1</i>	4,356	<i>Id2</i>	2,326	<i>Adamtsl4</i>	1,948
<i>Mir146</i>	3,635	<i>Ecm1</i>	2,325	<i>Slc39a4</i>	1,930
<i>Pou2f2</i>	3,525	<i>Slc25a2</i>	2,306	<i>Pisd-ps1</i>	1,925
<i>Mmp19</i>	3,520	<i>Tnfaip3</i>	2,297	<i>Il1a</i>	1,915
<i>Cd38</i>	3,450	<i>Dusp16</i>	2,225	<i>Arf5</i>	1,881
<i>Sntb2</i>	3,397	<i>Crispld2</i>	2,208	<i>Dusp5</i>	1,854
<i>Ubxn11</i>	3,317	<i>Tnip1</i>	2,197	<i>Cd14</i>	1,850
<i>Mir3108</i>	2,970	<i>Olfm4</i>	2,176	<i>Fkbp5</i>	1,847
<i>Ccl3</i>	2,909	<i>Rmnd5b</i>	2,168	<i>F11r</i>	1,844
<i>Stfa2</i>	2,873	<i>Ndufa12</i>	2,155	<i>Tlr7</i>	1,822
<i>Rilpl2</i>	2,871	<i>Klhl6</i>	2,127	<i>Clec4a3</i>	1,820
<i>Erdr1</i>	2,858	<i>Chn2</i>	2,118	<i>Slc22a4</i>	1,805
<i>Lacc1</i>	2,855	<i>Plk3</i>	2,114		

Tabla 8. Tabla de los genes con valores más altos del índice de inducción KO vs WT.
Ratio calculado como la diferencia de las medias en escala natural.

Seguidamente, en este análisis preliminar, decidimos buscar genes diferencialmente expresados entre los dos tipos de muestra que estuviesen relacionados con funciones específicas de los neutrófilos. En el caso de los neutrófilos aislados de ratones que carecen del receptor TLR4, encontramos una expresión significativamente diferencial de genes relacionados con la inhibición de proteasas (*Stfa1*, *Stfa2* y *Stfa3*) (Figura 75) y de genes de fosfatasa que intervienen en la inhibición de MAP quinasas (*Dusp5*, *Dusp2*, *Dusp16*) (Figura 75).

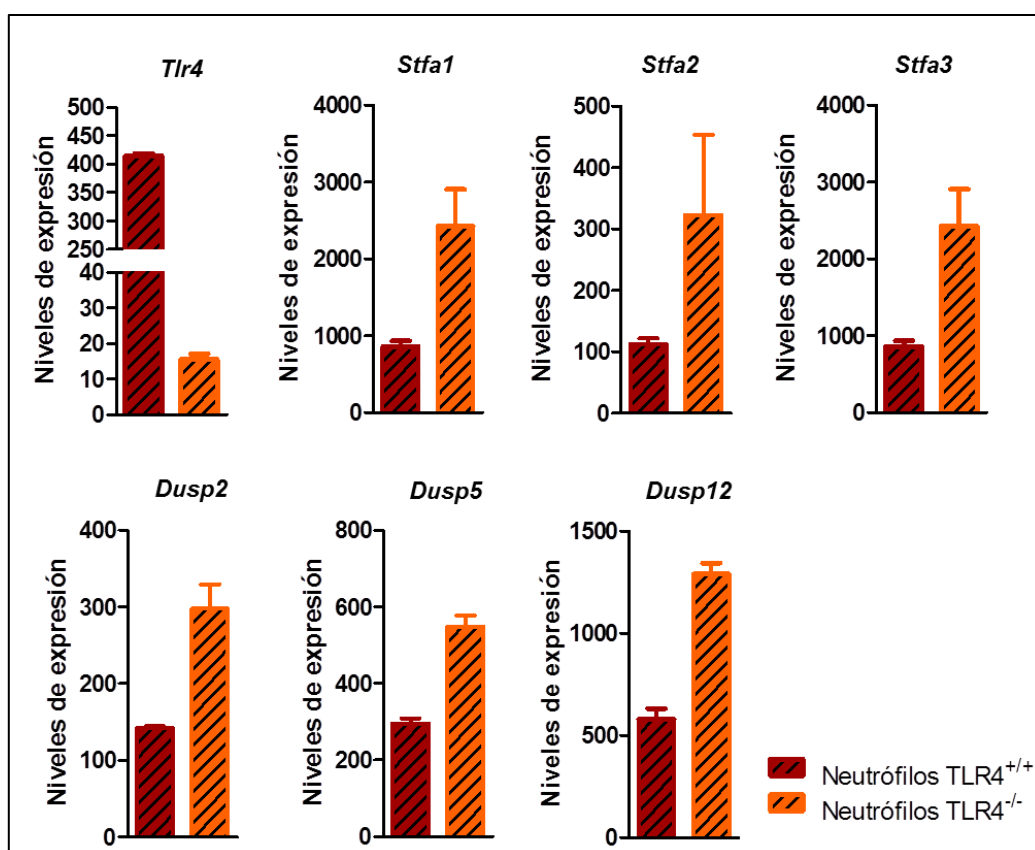


Figura 75. Niveles de expresión de algunos genes de interés. *Tlr4* (P-valor=0,00001; Índice de inducción KOvsWT=0,037), *Stfa1* (P-valor=0,00012; Índice de inducción KOvsWT=2,819), *Stfa2* (P-valor=0,00958; Índice de inducción KOvsWT=2,873), *Stfa3* (P-valor=0,00351; Índice de inducción KOvsWT=8,816), *Dusp2* (P-valor=0,00005; Índice de inducción KOvsWT=2,099), *Dusp5* (P-valor=0,00004; Índice de inducción KOvsWT=1,854), *Dusp12* (P-valor=0,00002; Índice de inducción KOvsWT=2,225).

Por último, decidimos buscar marcadores de superficie, que estuvieran diferencialmente expresados en ambas poblaciones de neutrófilos, según sus valores del índice de inducción KO vs WT > 1,8 (Figuras 76 y 77), con el objeto de

poder caracterizar las poblaciones con fenotipo N1 (predominante en $TLR4^{+/+}$) o fenotipo N2 (predominante en $TLR4^{-/-}$). Seleccionamos los marcadores CD38 y Fr11 (Cd321) por cumplir estas características y procedimos a su análisis por citometría de flujo, el cual reveló que, en efecto, existe un marcaje diferencial entre ambas poblaciones de neutrófilos, siendo la señal de estos marcadores más predominante en los neutrófilos de la sangre de ratones que carecen del receptor TLR4, 48 horas tras isquemia (Figura 76 y 77).

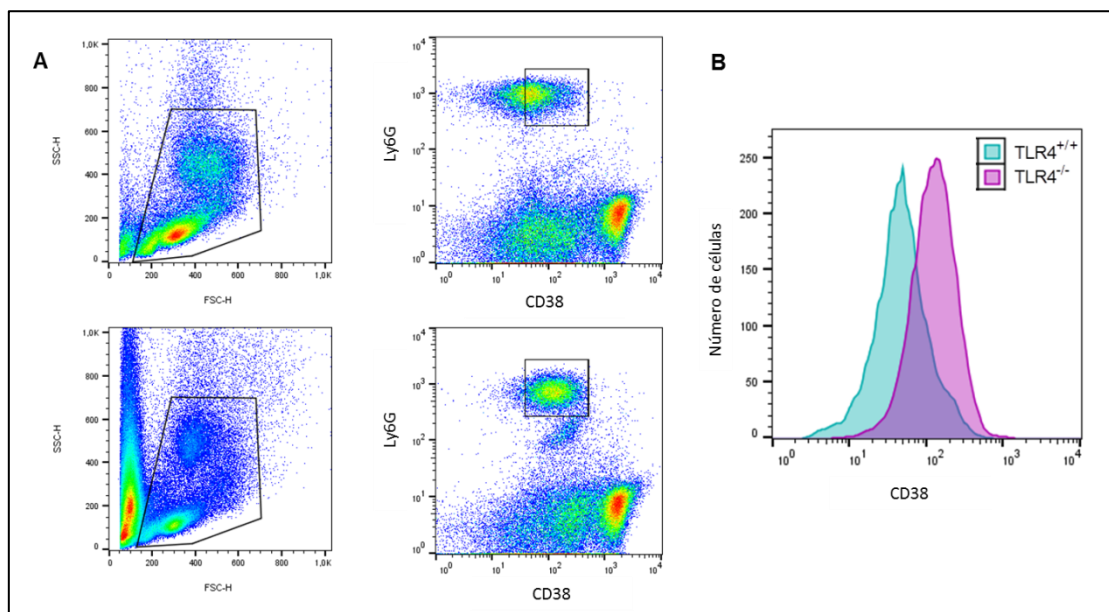


Figura 76. Expresión del receptor de superficie CD38 en neutrófilos. **A.** Imágenes representativas del análisis de citometría, con el software FlowJo, de los grupos MCAO $TLR4^{+/+}$ y MCAO $TLR4^{-/-}$ 48 horas tras la isquemia. **B.** Expresión diferencial del marcador de superficie CD38 en neutrófilos de la sangre de los grupos MCAO $TLR4^{+/+}$ y MCAO $TLR4^{-/-}$ 48 horas tras la isquemia.

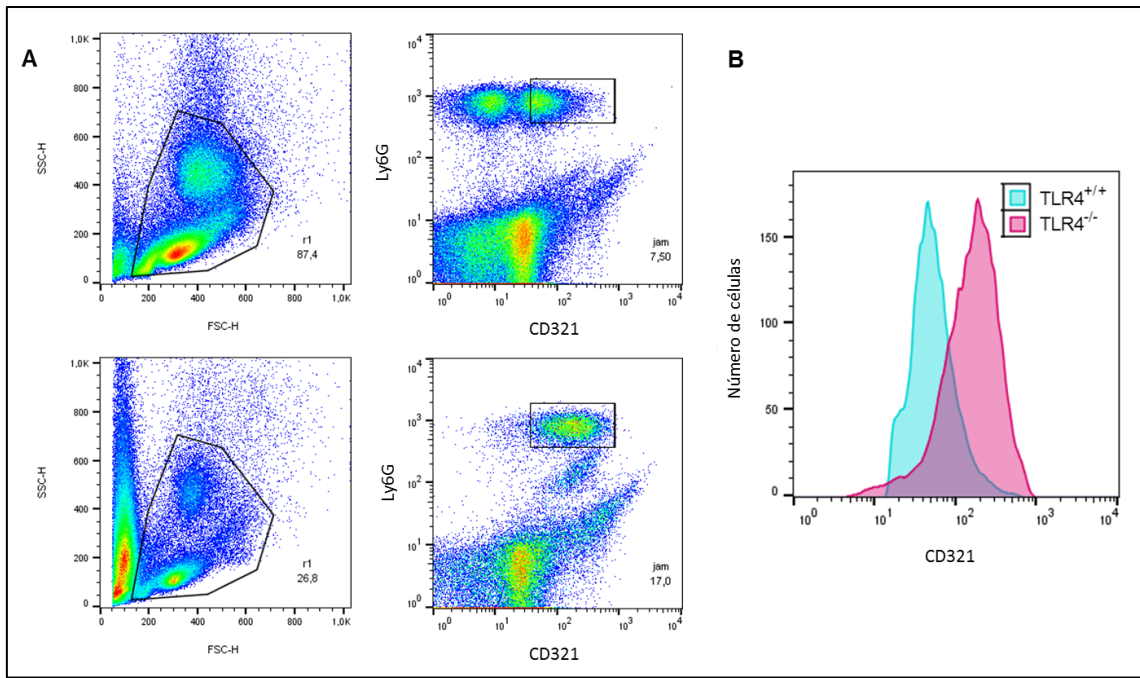


Figura 77. Expresión del receptor de superficie CD321 en neutrófilos. A. Imágenes representativas del análisis de citometría, con el software FlowJo, de los grupos MCAO TLR4^{+/+} y MCAO TLR4^{-/-} 48 horas tras la isquemia. **B.** Expresión diferencial del marcador de superficie CD321 en neutrófilos de la sangre de los grupos MCAO TLR4^{+/+} y MCAO TLR4^{-/-} 48 horas tras la isquemia.

DISCUSIÓN

1. EFECTO DE TLR4 EN EL FENÓMENO DE TH

Las terapias de recanalización, ya sean farmacológicas o mecánicas, están asociadas con un alto riesgo de padecer transformación hemorrágica sintomática, una complicación potencialmente mortal. En este sentido, la posibilidad de contar con una estrategia farmacológica que disminuyera el riesgo de transformación hemorrágica sería de altísimo interés. En estudios preclínicos, se ha demostrado que varios compuestos disminuyen el daño de la barrera hematoencefálica y la TH inducida por t-PA (Ho et al., 2016), pero ninguno de ellos reduce el riesgo de sufrir TH en la clínica. Conocer los mecanismos que conducen a este proceso puede ayudar a identificar dianas terapéuticas para prevenir esta secuela. Por lo tanto, el presente objetivo se diseñó para elucidar las posibles vías por las que el receptor TLR4 está implicado en el proceso de la TH, estudiándose en concreto como posibles mecanismos su implicación en la BHE, y el papel de la MMP-9 y de la infiltración de neutrófilos.

Para llevar a cabo este primer bloque de experimentos, se empleó como base el modelo tromboembólico descrito por Orset y colaboradores (Orset et al., 2007), adaptado por nuestro grupo para su utilización como modelo de transformación hemorrágica (García-Yébenes et al., 2011); este modelo es de gran valor por ser reproducible y también traslacional, ya que se asemeja en gran medida a la situación clínica del paciente con respecto a aspectos tales como reperusión espontánea, porcentajes de reperusión después de la administración de t-PA, etc. Al utilizar este modelo, la reperusión temprana con t-PA reduce el volumen de infarto, hecho confirmado posteriormente por otros autores en otros modelos de isquemia (Durand et al., 2012), como sucede en el contexto clínico (para revisión ver (Molina and Alvarez-Sabín, 2009)), confirmando que, cuanto antes ocurre la reperusión, menor es el tamaño de la lesión. Y, lo más importante, en este modelo se produce el fenómeno de TH tras la administración tardía de t-PA, por lo cual resulta ideal para estudiar problemas relacionados con la terapia trombolítica y los mecanismos implicados en sus efectos secundarios, como la TH. Utilizando ratones TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} con este modelo, se demuestra por primera vez, en un modelo

tromboembólico, que la ausencia del receptor TLR4 produce un efecto neuroprotector, ya que el volumen de infarto de los animales TLR4^{-/-} es menor que el de los animales que expresan el receptor, como ya se ha descrito en otros modelos de isquemia (Caso et al., 2007).

Pero más importante aún es el hecho de que nuestros resultados indican, además, que TLR4 está implicado en la TH inducida por la administración tardía de t-PA. Así, la presencia de TLR4 i) aumenta la gravedad de la hemorragia y del área de sangrado, y ii) exacerba el daño de la BHE y aumenta la expresión de MMP-9 tras la administración tardía de t-PA. Hasta la fecha, en nuestro conocimiento, este estudio es el primero en indicar que el bloqueo de TLR4 puede proporcionar protección después de un ictus isquémico tratado con t-PA.

Como decíamos, TLR4 media la TH inducida tras la infusión tardía de t-PA ya que, en los animales que no expresan el receptor TLR4, la TH se reduce de forma significativa. Además, esta reducción se mantiene significativamente reducida después de la normalización por el tamaño de infarto. Este dato es muy importante ya que la reducción en la aparición de la TH se podría deber al menor volumen de infarto que presentan los animales deficientes en TLR4, más que a mecanismos relacionados directamente con la expresión de TLR4. La normalización del tamaño de la hemorragia por el tamaño de la lesión confirma, por tanto, el efecto directo del receptor. Aunque la implicación de TLR4 en el daño cerebral y la inflamación después de un ictus está muy contrastada (Cao et al., 2007; Caso et al., 2007; Tang et al., 2007), esta es la primera evidencia que demuestra la participación de TLR4 en TH inducida por t-PA.

Apoyando nuestras conclusiones, otros autores han demostrado que tras una hemorragia intracerebral (HIC) la expresión de TLR4 está significativamente incrementada aproximadamente tras las 6 horas de la inducción de la hemorragia (Teng et al., 2009). Además, se ha demostrado que la ruta de señalización de TLR4 contribuye a un peor pronóstico tras HIC tanto en animales como en pacientes (Sansing et al., 2011) y que los fármacos que bloquean la señalización de TLR4, tales

como en anticuerpo Mts50, suprimen el daño inflamatorio inducido por HIC (Fang et al., 2013). Todos estos datos apoyan los resultados que hemos obtenido.

En el presente estudio, demostramos que TLR4 se expresa principalmente en neuronas 24 horas después de isquemia en el grupo con TH (isquémico con reperusión tardía con t-PA) en ratones TLR4^{+/+}. Otros autores han encontrado la expresión de TLR4 predominantemente en neuronas, astrocitos y células microgliales CD11b⁺, pero también asociada con vasos sanguíneos (Fang et al., 2013; Lin et al., 2012; Teng et al., 2009). En este sentido, la expresión de TLR4 se ha descrito en varios tipos celulares del sistema nervioso central incluyendo microglía (Lehnardt et al., 2002; Olson and Miller, 2004), neuronas (Tang et al., 2008) y astrocitos (Pernhorst et al., 2013), así como en células sanguíneas periféricas tales como leucocitos, macrófagos (O'Mahony et al., 2008) y plaquetas (Berthet et al., 2010). Nosotros, recientemente, hemos demostrado un incremento de la expresión de TLR4 en células microgliales, 2 días tras isquemia, tanto mediante estudios de imagen PET (incremento en la unión de [¹¹C]PK11195, radiotrazador microglial) como con estudios de inmunofluorescencia (células TSPO+ y CD11b+) (Moraga et al., 2016).

En segundo lugar, hemos estudiado algunos de los mecanismos que subyacen a la implicación de TLR4 en la transformación hemorrágica. Se sabe que tanto la activación de las proteasas como la infiltración de los glóbulos blancos circulantes parecen desempeñar un papel importante en el daño de la BHE y TH, particularmente después de la recanalización inducida por t-PA. Proteasas como la MMP-9 degrada los componentes de la membrana basal y causa la ruptura de la BHE, un efecto que está potenciado por la administración de t-PA (Wang et al., 2003). Previamente, nuestro grupo había demostrado una mayor inmunorreactividad de MMP-9 en el cerebro isquémico de los ratones “salvajes” (Caso et al., 2007). Del mismo modo, nuestros datos ahora demuestran una mayor expresión de MMP-9 en los animales con reperusión tardía por t-PA, donde la TH es más frecuente, sugiriendo que el aumento de MMP9 puede ser el mecanismo implicado en la transformación dependiente de TLR4, y apoyando que MMP-9 es un marcador fiable de TH como sugiere la evidencia clínica (Castellanos et al., 2003). Es importante destacar que los ratones con deficiencia de TLR4 presentan una

expresión de MMP-9 mucho más baja; es improbable que ello sea debido al menor tamaño de infarto ya que estudios previos han demostrado que los ratones deficientes en TLR4 presentan una menor expresión de MMP9 a tiempos muy tempranos tras el daño isquémico, cuando todavía el infarto cerebral no ha progresado (Qiu et al., 2010). Por último, la correlación positiva que hemos encontrado entre el tamaño de la hemorragia y el área de la inmunoreactividad de MMP9 en los animales que expresan TLR4 y tratados con t-PA a las 3 horas refuerzan dicha conclusión. Esta asociación se corrobora por nuestros resultados que demuestran que la ubicación de MMP9 es principalmente vascular como se demuestra por la mayoritaria co-localización con el marcador de endotelio GLUT-1 que hemos demostrado.

Las fuentes más probables de MMP-9, según la literatura, son tanto los neutrófilos como el propio endotelio vascular. Por una parte, los neutrófilos tienen un alto contenido de MMP-9 almacenada en gránulos y que liberan cuando se activan y/o en presencia de t-PA (Cuadrado et al., 2008). Por otro lado, el endotelio interviene en la formación de esta proteasa por mecanismos t-PA y ERO-dependientes, ambos presentes durante la reperusión (Harada et al., 2012). En los últimos años se ha puesto de manifiesto una abundante evidencia científica sobre el papel de la MMP-9 de origen neutrofílico en la TH. Sin embargo, en nuestro estudio hemos observado, corroborando los estudios de Harada y colaboradores (Harada et al., 2012), que la inducción de MMP-9 ocurre claramente en la vasculatura cerebral de los animales que presentan hemorragias, observándose una mínima expresión de esta proteasa en los neutrófilos infiltrados en la zona cerebral afectada por el ictus. Una posible explicación de que los neutrófilos extravasados no la presenten podría ser el hecho de que durante el proceso de infiltración se activan, liberando el contenido de sus gránulos, hecho potenciado por la propia administración de t-PA (Cuadrado et al., 2008).

Debido al patrón de expresión que hemos encontrado, principalmente vascular, la sobreexpresión de MMP-9 en los vasos sanguíneos podría inducirse de una forma paracrina por la propia activación del receptor TLR4 presente en

neuronas y quizás también por otras células que expresan TLR4 como monocitos, astrocitos y microglía. En este contexto, se ha demostrado que la señalización de TLR4 neuronal induce la activación del endotelio cerebral (Leow-Dyke et al., 2012), lo que podría conducir a la expresión de MMP-9. Esto no descarta que mecanismos autocrinos puedan estar igualmente implicados; de hecho, se ha demostrado que HMGB1 desencadena la sobreexpresión de MMP-9 en neuronas y astrocitos predominantemente a través de la activación de TLR4 después de la isquemia cerebral (Qiu et al., 2010). Todos estos datos apoyan firmemente la ruta TLR4-MMP-9 como un mecanismo plausible para la TH inducida por t-PA.

El último de los mecanismos implicados en la TH que hemos estudiado es la infiltración de células inmunes, en concreto de neutrófilos, de los cuales se ha descrito que contribuyen al daño de la BHE tanto al interaccionar con la pared vascular durante el proceso de infiltración (Weber et al., 2007) como liberando moléculas una vez infiltrados, fundamentalmente MMP-9 (Ludewig et al., 2013). De hecho, existen estudios que lo involucran en TH (Rosell et al., 2008). El presente trabajo demuestra que, al menos en nuestro modelo, la importancia de la infiltración de estas células se ve disminuida por la falta de diferencias en los grupos estudiados después de la administración tardía de t-PA. Por lo tanto, la infiltración no parece exacerbada cuando existe TH. Algunos trabajos habían descrito que la recanalización arterial podría facilitar la llegada de neutrófilos al foco isquémico (Wang and Lo, 2003), resultados no confirmados por este estudio.

Este estudio presenta algunas limitaciones que debemos tener en cuenta: 1) la administración tardía se estableció en un momento temporal (3 horas) que a nivel clínico es todavía seguro, si bien las diferencias se deben probablemente a las propias dependientes de la especie usada; 2) el efecto protector de la ausencia de TLR4 requiere confirmarse en experimentos a largo plazo y mediante tests conductuales; por último, 3) queda por establecerse la participación de TLR4 en la TH inducida por la trombectomía, una estrategia de recanalización cada vez más utilizada.

Como conclusión, este primer bloque de resultados de la presente tesis doctoral demuestra que la ausencia de TLR4 disminuye la TH después de la administración tardía de t-PA. El aumento de la expresión de MMP-9 podría ser el mecanismo subyacente a este efecto. Nuestros datos apoyan la inhibición de TLR4 como una prometedora diana terapéutica para prevenir la TH inducida por t-PA, y para aumentar el número de pacientes que se pueden beneficiar de esta terapia que, como se explicó en la introducción de este trabajo, actualmente es muy limitado.

2. EFECTO D TLR4 EN LA INFILTRACIÓN AGUDA TRAS ICTUS

En este segundo bloque de resultados hemos llevado a cabo distintas aproximaciones para estudiar el efecto de TLR4 sobre el proceso inflamatorio agudo tras un ictus experimental.

2.1. TLR4 COMO MEDIADOR DEL DAÑO ISQUÉMICO

En un primer lugar, en la presente Tesis Doctoral hemos corroborado la implicación del receptor TLR4 en el daño cerebral que se produce después de un ictus experimental, resultados que están de acuerdo con los previos publicados por nuestro grupo (Caso et al., 2007). De esta forma, hemos observado que los ratones que expresan de forma normal el receptor TLR4 (TLR4^{+/+}) presentan volúmenes de infarto significativamente mayores que los ratones deficientes en el receptor (TLR4^{-/-}).

Anteriormente, en nuestro grupo de investigación describimos que los ratones deficientes para TLR4 presentan, tras el ictus, una menor expresión de mediadores pro-inflamatorios que han sido implicados en el daño isquémico (IRF-1, iNOS, COX-2 y MMP9). Además, se observaron niveles reducidos de interferon- γ y del marcador de peroxidación lipídica, malondialdehído (Caso et al., 2007). Todos estos resultados indicaban que la señalización de TLR4 induce una potente respuesta inflamatoria responsable del daño cerebral tras un ictus (Caso et al., 2007).

Varios trabajos, simultáneos y posteriores, han confirmado la participación de distintos TLRs en el daño isquémico (Cao et al., 2007; Caso et al., 2007; Tang et al., 2007; Tang et al., 2013), poniendo de manifiesto el hecho de que esta patología siempre va acompañada de una fuerte respuesta inflamatoria, cuyo inicio se debe en gran medida a la activación de estos receptores (Aderem and Ulevitch, 2000).

Como se ha comentado ya durante la presente Tesis Doctoral, la respuesta inmune innata juega un papel fundamental en la evolución de la lesión cerebral isquémica. Durante el proceso de neuroinflamación que se establece tras un ictus, se produce la liberación de diferentes mediadores solubles (citoquinas y

quimioquinas) y la activación de células especializadas del propio parénquima cerebral y/o reclutadas desde la periferia (Aderem and Ulevitch, 2000; Amantea et al., 2014; Courties et al., 2014). Concretamente, el efecto del receptor TLR4 en las células circulantes derivadas de la médula ósea se exploró en un estudio realizado en 2011 con animales deficientes para este receptor (Yang et al., 2011). En este trabajo, se demostró que la expresión de TLR4 en las células inmunes periféricas participa en el daño isquémico en modelos experimentales de ictus. En efecto, estos estudios demostraron que, cuando a los ratones con un fenotipo salvaje para TLR4 o *wild type* se les eliminan estas células por irradiación y, posteriormente, se les introducen las poblaciones de la médula ósea de un ratón carente del receptor, el volumen de infarto disminuye. Por el contrario, si se irradian ratones deficientes para TLR4 y se lleva a cabo la transferencia adoptiva de células de la médula de los ratones que si presentaban el receptor, el volumen de infarto aumenta.

2.2. PAPEL DE TLR4 EN LA MICROGLÍA

En lo que se refiere a las células activadas en el propio parénquima, principalmente microglía y macrófagos perivasculares, está aceptado que la señalización por TLR4 está implicada en la activación clásica de la microglía, que reduce la fagocitosis, aumenta la secreción de mediadores pro-inflamatorios y produce daño neuronal. Esto correspondería a un fenotipo de microglía/macrófago al que se denomina fenotipo clásico o M1. Pero también se ha descrito otro fenotipo, llamado alternativo o M2, con células cuya actividad fagocítica es más intensa y la producción de mediadores pro-inflamatorios más reducida (Hu et al., 2012). Ambos fenotipos se han descrito en el contexto de la enfermedad cerebrovascular, aunque con distintos perfiles temporales (Hu et al., 2012). Estudios recientes publicados por nuestro grupo han demostrado, mediante técnicas avanzadas en neuroimagen, que los animales TLR4^{-/-} presentan menos proliferación en las células de la microglía dos días tras la isquemia (Moraga et al., 2016). Estos resultados están de acuerdo con los mostrados en la presente Tesis Doctoral obtenidos mediante técnicas de citometría de flujo, con los que hemos puesto de manifiesto la presencia de un menor número de células de microglía en los animales carentes de TLR4. Esta menor proliferación de la microglía podría ser en parte

responsable de la disminución del tamaño de la lesión, si bien existe mucha controversia acerca del papel que juegan estas células tras la isquemia cerebral. Así, algunos estudios sugieren que la microgliosis puede jugar un papel neuroprotector tras un ictus (Denes et al., 2007; Faustino et al., 2011; Lalancette-Hébert et al., 2007) y llevar a cabo funciones neurorreparadoras en el parénquima cerebral dañado a tiempos tardíos (Ballesteros et al., 2014b; Schilling et al., 2005). TLR4 podría ser clave en este proceso ya que, por un lado, iniciaría la activación clásica (Mosser and Edwards, 2008) por LPS y otros DAMPs con una respuesta inflamatoria aguda pero, a la vez, facilitaría los procesos de resolución más tardíos.

Debido a su ontogénesis (Kierdorf and Prinz, 2013), características y funciones propias, como, por ejemplo, la **remodelación sináptica** de la microglía (Kim et al., 2013), actualmente se desconoce a ciencia cierta si el espectro de activación que sufren estas células durante el ictus se encuentra enmarcado en el paradigma de activación M1/M2 descrito para otras células mieloides ya que la existencia del doble fenotipo en microglía es controvertido. En el contexto de la dicotomía M1/M2 se ha demostrado que el receptor TLR4, en presencia de complejos inmunes, induce un fenotipo alternativo M2b en macrófagos (Mantovani et al., 2004). De manera similar, se ha demostrado que TLR4, a través de la vía dependiente de TRIF y activando IRF3, promovería la conversión del fenotipo microglial M1 al anti-inflamatorio M2 (Tarassishin et al., 2011). En cualquier caso, estos trabajos indican que la señalización por TLR4 en la microglía podría estar mediando diferentes estados de activación. Serán necesarios estudios de transcriptómica focalizados en caracterizar cómo afecta la ausencia de TLR4 al perfil transcripcional de la microglía tras la isquemia y de los mecanismos moleculares que median estos cambios para llevar a cabo una caracterización fina de los cambios fenotípicos que produce TLR4 en estas células y esclarecer así si pueden enmarcarse en alguno de los estados de activación de espectro M1/M2 descritos en la bibliografía. De cualquier forma, los resultados de esta Tesis Doctoral apoyan la existencia de una menor microgliosis tras la isquemia cerebral en ausencia de TLR4.

2.3. PAPEL PERIFÉRICO DE TLR4

Por otro lado, además de la microglía, también hemos descrito cómo se comportan otras células inmunes tras el estímulo isquémico, desde sus poblaciones en la médula ósea, su presencia en la circulación periférica y posterior infiltración al tejido dañado. Aunque no hemos podido relacionar todos los resultados obtenidos en la médula ósea con los otros dos tejidos (sangre y parénquima cerebral), muy posiblemente por encontrarnos en un solo momento de observación tras la isquemia (48h tras MCAO), sí que hemos podido sacar conclusiones sobre las poblaciones de la sangre con respecto a aquellas que se infiltran al parénquima cerebral tras la isquemia.

LINFOCITOS

En el caso de los linfocitos B y T, no encontramos diferencias significativas en la médula ósea en estas poblaciones celulares. Está descrito que tras isquemia experimental se producen cambios de estos tipos celulares a tiempos experimentales diferentes a los del presente estudio (4, 24 y 72 horas tras isquemia) (Denes et al., 2011), lo que puede explicar que nosotros no observemos diferencias significativas a los tiempos estudiados.

En cuanto a las poblaciones en sangre, únicamente hemos observado un aumento de linfocitos T en los animales TLR4^{+/+} a las 48h tras la isquemia, así como, en los animales TLR4^{-/-} y de forma general, una disminución de los linfocitos T y un aumento de los linfocitos B, tanto en isquemia como en condiciones basales.

En modelos murinos transgénicos deficientes en ambas poblaciones de células está descrito que mejora significativamente el daño histológico a tiempos tempranos tras la isquemia cerebral focal, en asociación con la supresión de mediadores inflamatorios en el cerebro (Hurn et al., 2007; Xiong et al., 2013). Contrariamente, otra investigación observó que los ratones deficientes en células B no mostraron mejoría de la lesión isquémica, lo que sugiere que las células T y no las células B estaban implicadas en la lesión cerebral isquémica precoz (Gu et al., 2015; Yilmaz et al., 2006). Estos resultados podrían explicar el aumento observado en

nuestro estudio de la población de células B en sangre en los ratones TLR4^{-/-} a pesar de presentar un menor volumen de infarto.

En cuanto a la infiltración de estos tipos celulares en el parénquima cerebral, en nuestro trabajo no se analizaron poblaciones diferenciadas (células T y B), por lo que no se pudo relacionar su presencia en cada órgano periférico (médula ósea y sangre) con el infarto. Un estudio reciente demostró que los efectos protectores de la deficiencia de células T en el cerebro isquémico eran dependientes del modelo de isquemia realizado (Xiong et al., 2013). El estudio de infiltración tras un modelo permanente de ligadura en animales con y sin receptor TLR4 se ha realizado anteriormente en nuestro grupo, donde se observó un aumento de la población de linfocitos (T y B) en el infarto de ratones TLR4^{+/-} dos días tras la lesión (Moraga, 2014)

MONOCITOS

La médula ósea es la fuente primaria de granulocitos y monocitos, que son reclutados al cerebro inflamado y contribuyen a muchas enfermedades cerebrales, incluyendo la enfermedad cerebrovascular (D'Mello et al., 2009; Kim et al., 2009; McColl et al., 2008). En relación a la población de monocitos Ly6C^{hi} en la médula ósea, hemos encontrado un aumento significativo de estas células en los animales isquémicos con respecto a los animales naïve, evidencia que ya se ha descrito anteriormente en modelos experimentales de isquemia (Kim et al., 2014). Este resultado está de acuerdo con la idea de que la isquemia produce una movilización de estas células en respuesta a la agresión. Sin embargo, no observamos diferencias significativas dependientes del receptor TLR4.

Los resultados en las poblaciones de sangre de monocitos Ly6C^{hi} no muestran ninguna diferencia con la isquemia, ni dependiente de la presencia o ausencia de este receptor. Algunos estudios muestran que, 24 horas tras isquemia experimental, se produce un aumento de esta población en sangre (Chu et al., 2015). Más concretamente, se ha demostrado que tras un ictus isquémico aumenta de forma importante el número de monocitos proinflamatorios (Ly6C^{hi}) en la circulación sanguínea durante la fase aguda de la enfermedad cerebrovascular

isquémica (3 h tras el inicio de la isquemia) y disminuye su número por debajo de los niveles pre-isquémicos en una fase subaguda y crónica (de 1 a 7 días después de la isquemia) (Kim et al., 2014). Con lo cual puede que, de nuevo, no veamos diferencias en la población de monocitos Ly6C^{hi} de la sangre debido al momento en el que estamos analizando la muestra. En relación al papel que puede estar ejerciendo TLR4 en este tipo celular, estudios clínicos relacionan la gravedad de la lesión isquémica con un aumento en la expresión del receptor TLR4 en monocitos circulantes de la sangre (Urrea et al., 2009a; Yang et al., 2008). Sin embargo, nosotros no podemos corroborar estos datos ya que hemos analizado únicamente una población concreta de monocitos en la que no vemos cambios en sangre en animales con presencia del receptor.

En cuanto a la infiltración en el parénquima cerebral, en el caso de los monocitos Ly6C^{hi} , nuestros resultados muestran que hay un mayor número total de estas células en las áreas infartadas de los animales que expresan TLR4. Además, ambos genotipos presentan un aumento significativo de MDMs infiltrados en cerebro en comparación con los animales naïve. Sin embargo, cuando normalizamos el número de células infiltradas en el infarto por el volumen (mm^3), observamos que no hay diferencias significativas entre los grupos isquémicos. Estudios previos, han demostrado que, tras 24 horas de la isquemia, los monocitos pro-inflamatorios $\text{CCR2}^+ \text{Ly6C}^{\text{hi}}$ inmaduros se infiltran en la zona del borde del infarto, y se diferencian a monocitos Ly6C^{lo} maduros en el core de la lesión (Gliem et al., 2012). Sin embargo, la contribución exacta de los subgrupos de monocitos sigue siendo difícil de entender, ya que no está claro si la diferenciación de los monocitos pro-inflamatorios $\text{CCR2}^+ (\text{Ly6C}^{\text{high}})$ a monocitos antiinflamatorios (Ly6C^{low}) es necesario en este proceso, ni los mecanismos que regulan este hecho. Otro estudio reciente demostró que la infiltración de monocitos pro-inflamatorios $\text{CCR2}^+ (\text{Ly6C}^{\text{hi}})$ en el cerebro isquémico juega un papel beneficioso en la limitación de la lesión isquémica debido a su posterior diferenciación a MDM de fenotipo antiinflamatorio M2 y a su capacidad para promover la polarización de MDM/microglía adyacentes hacia un fenotipo anti-inflamatorio M2 (Chu et al., 2015). Lo cierto es que tras normalizar nuestros datos no observamos diferencias significativas en el número de monocitos

Ly6C^{hi} infiltrados a las 48 horas tras isquemia entre ambos genotipos, por lo que serán necesarios estudios más concretos sobre cómo afecta la ausencia del receptor TLR4 a la infiltración, e incluso al fenotipo de estas células, en un futuro.

NEUTRÓFILOS

Por último, tras 48 horas de la isquemia, se observó una disminución de los neutrófilos de la médula ósea en comparación con los animales naïve, lo que se asume debido a la rápida liberación de granulocitos que se produce tras un daño isquémico (Denes et al., 2011). Este hecho, además, se correlaciona con el aumento de neutrófilos circulantes que vemos en la sangre de los animales isquémicos. La primera evidencia a destacar, por lo tanto, de las poblaciones de células de la sangre, es el mayor número de neutrófilos circulantes que presentan los animales isquémicos 48 horas tras la isquemia.

Sorprendentemente, en el presente estudio, observamos un número mayor de neutrófilos en la zona infartada de los animales TLR4^{-/-}, tanto por técnicas de citometría de flujo, donde vemos un aumento de neutrófilos infiltrados al normalizar por el volumen de infarto (mm³), como por técnicas de inmunofluorescencia.

Ya se ha comentado que el ictus desencadena una fuerte respuesta inflamatoria caracterizada no sólo por la rápida activación de células residentes (principalmente microglía) sino también por una mayor infiltración de células inflamatorias circulantes, como neutrófilos, monocitos y/o macrófagos, y linfocitos (para revisión ver (Cuartero et al., 2015; Gelderblom et al., 2009; Jin et al., 2010a). De hecho, se piensa que, a mayor lesión isquémica, mayor activación microglial y mayor reclutamiento de células. En este sentido, existen evidencias que señalan al receptor TLR4 como iniciador del reclutamiento de leucocitos (Zhou et al., 2006; Zhou et al., 2009) y, de hecho, el efecto neuroprotector del antagonista de TLR4 TAK 242 se debería, al menos en parte, a una menor infiltración de células inflamatorias periféricas (Wang et al., 2013).

2.4. PAPEL DE TLR4 EN EL FENOTIPO DE NEUTRÓFILOS

En el presente estudio, decidimos investigar los efectos de TLR4 sobre la respuesta inflamatoria periférica, concretamente, la orquestada por la infiltración de neutrófilos de la sangre, un proceso que ha demostrado mediar la lesión tisular tanto en la enfermedad cerebrovascular como en otras enfermedades (del Zoppo, 2010; Wang et al., 2007). Aunque estudios recientes hablan de la localización predominante de los neutrófilos dentro de los vasos sanguíneos tras la oclusión transitoria de la ACM (Enzmann et al., 2013), en nuestro modelo de isquemia la mayoría de los neutrófilos se encuentran principalmente infiltrados en el parénquima cerebral, como han mostrado los resultados.

De acuerdo con su papel lesivo en la inflamación, encontramos una correlación positiva entre el número de neutrófilos infiltrados y el volumen de infarto en los animales TLR4^{+/+}, hecho plenamente estudiado incluso en la clínica (Buck et al., 2008). Sorprendentemente, como decíamos, encontramos que la ausencia de TLR4 aumenta el número de neutrófilos infiltrados 48 horas tras la isquemia, incluso invirtiéndose dicha correlación. En nuestro conocimiento, este es el primer estudio estereológico, confirmado con análisis de citometría de flujo de las células inmunes presentes en el parénquima cerebral, que evalúa el efecto de este receptor en la infiltración de neutrófilos (analizados como NIMP-R14⁺ por inmunofluorescencia, o como CD11b⁺Ly6G⁺ por citometría de flujo) en la patología de la isquemia cerebral.

La infiltración de neutrófilos en el cerebro isquémico ha sido reconocida como un importante factor patogénico (del Zoppo, 2010) y, de hecho, nuestros hallazgos muestran que la eliminación de los neutrófilos causa una reducción significativa del volumen del infarto en los animales TLR4^{+/+}, de acuerdo con datos previos (Murikinati et al., 2010). Sin embargo, en animales TLR4^{-/-}, la eliminación de los neutrófilos no logró inducir la neuroprotección sugiriendo, en primer lugar que, en ausencia de TLR4, los neutrófilos no juegan un papel deletéreo y, segundo, que el efecto neuroprotector que encontramos en los animales TLR4^{-/-} es dependiente, al menos en parte, de los neutrófilos. El hecho de que la neuroprotección encontrada en los animales deficientes de TLR4 esté inesperadamente asociada con un

aumento de la tasa de infiltración de neutrófilos, junto con el aumento en el volumen de infarto tras la eliminación de neutrófilos en los animales TLR4^{-/-}, nos llevó a hipotetizar la existencia de subgrupos de neutrófilos con diferentes funciones fisiopatológicas. En este contexto, la ausencia de TLR4 podría favorecer una reprogramación del neutrófilo hacia un fenotipo con propiedades beneficiosas, como las atribuidas al fenotipo M2 de macrófagos, asociadas con la inhibición de la inflamación y la promoción de la reparación de tejidos (Gordon and Martinez, 2010; Mosser and Edwards, 2008).

Es de destacar que cada vez existen más evidencias que indican que, además de macrófagos y linfocitos, los neutrófilos son susceptibles de sufrir una polarización a un fenotipo “M2-like”, como es el caso de los neutrófilos asociados a tumores (Fridlender et al., 2009). En este contexto, investigaciones recientes a nivel oncológico muestran que los neutrófilos asociados a tumores (TANs) pueden adquirir un fenotipo pro-tumor (N2) caracterizado por la expresión de arginasa I, CCL2 y CCL5, una polarización impulsada en gran medida por el microambiente tumoral del factor de crecimiento transformante β (Fridlender et al., 2009; Shaul et al., 2016).

En el escenario de la enfermedad cerebrovascular, hemos puesto de manifiesto que los neutrófilos forman una población heterogénea, como lo demuestra el hallazgo de un subconjunto de neutrófilos que expresan marcadores M2 bien establecidos, como la quitinasa 3 (Ym1). En esta línea, recientemente nuestro grupo ha publicado que, tras ictus, la población de neutrófilos que infiltra el cerebro es heterogénea, lo que se manifiesta por la existencia de subpoblación de neutrófilos que expresan marcadores asociados al fenotipo alternativo de macrófagos (Cuartero et al., 2013). Por homología con la activación del macrófago y por estudios previos en el contexto de cáncer (Fridlender et al., 2009), hemos denominado a estos neutrófilos alternativos o N2 (Cuartero et al., 2013). De hecho, nuestro grupo fue pionero en demostrar la primera evidencia de la reprogramación de neutrófilos en la inflamación cerebral, mediante la modulación por activación del receptor nuclear PPAR γ concomitante con una mejora en el desenlace de la enfermedad cerebrovascular.

Hasta la fecha, varios grupos, incluido el nuestro, habían mostrado propiedades neuroprotectoras de la ausencia del receptor TLR4 en modelos de isquemia cerebral (Cao et al., 2007; Caso et al., 2007; Shichita et al., 2012; Tang et al., 2007) y que se atribuyeron principalmente a una mera inhibición del proceso inflamatorio. Ahora, nuestro estudio revela que el efecto va más allá, implicando un proceso activo de reprogramación del neutrófilo hacia fenotipos de naturaleza resolutive.

Por lo tanto, postulamos que la ausencia del receptor podría inducir una activación hacia un fenotipo N2 de neutrófilos que podría explicar la neuroprotección encontrada, a pesar de que un mayor número de estas células se infiltran al parénquima cerebral. Entre estas moléculas, Ym1 es una quitinasa considerada como un marcador específico de la polarización M2 (activación alternativa) de los macrófagos en ratón, y su expresión también ha sido demostrada en neutrófilos (Cuartero et al., 2013; Harbord et al., 2002) y en el cerebro en condiciones inflamatorias (Hung et al., 2002). Ym1 se ha implicado además en la reorganización matricial, la cicatrización de la herida, la regulación negativa de la inflamación, y su expresión cerebral se ha asociado con neuroprotección (Gordon and Martinez, 2010; Ohtaki et al., 2008; Tada et al., 2011). Puede ser que, debido a su acción extracelular sobre la reorganización de la matriz, la expresión de Ym1 y la secreción de esta molécula por los neutrófilos juegue un papel fundamental en la neuroprotección tras isquemia.

En nuestro trabajo, seleccionamos Ym1 como marcador de neutrófilos N2, y realizamos tanto estudios por citometría de flujo, como una cuantificación cuantitativa estereológica de los subgrupos de neutrófilos Ym1⁻ (N1) y Ym1⁺ (N2) en el cerebro isquémico, para explorar si la activación de TLR4 estaba afectando su equilibrio fenotípico. Curiosamente, a las 48 horas, el 45% de neutrófilos cerebrales fueron positivos para esta quitinasa en los animales TLR4^{-/-}, en comparación con los animales TLR4^{+/+}, cuyo porcentaje de neutrófilos N2 fue de aproximadamente el 25%. El aumento del número de neutrófilos N2 tras la isquemia en los animales que carecen del receptor es probablemente atribuible a una infiltración aumentada de estas células procedentes de la sangre, puesto que nuestros resultados indican que existe una reducción en los neutrófilos N2 de la sangre en los animales TLR4^{-/-} 48 h

tras la oclusión en comparación con los animales TLR4^{+/+}, a pesar de existir una movilización similar en la médula ósea en ambos genotipos. Esto parece implicar una mayor capacidad para infiltrarse en el tejido por parte de los neutrófilos TLR4^{-/-}. Se necesitan más estudios para aclarar si esta población Ym1 es homogénea o si, por el contrario, consiste en diferentes subconjuntos de neutrófilos. De hecho, existen trabajos que hablan de poblaciones heterogéneas de neutrófilos, dependientes de la activación de este receptor, como es el caso de la existencia de un fenotipo más envejecido, promovido por la microbiota intestinal al activar TLR4 y que tendría características diferentes (Zhang et al., 2015).

Además, debemos destacar que se detectó una subpoblación de células Ym1⁺ NIMP-R14⁻ CD11b⁺ Ly6G⁻ en el cerebro isquémico; debido a que no se encontró expresión detectable de Ym1⁺ en células CD45^{low} CD11b⁺ por FACS, estos datos sugieren que esta población podría corresponder a monocitos infiltrantes, aunque se requieren más estudios para determinar esta cuestión, como la inclusión de marcadores tipo Ly-6C, CCR2 o CD115.

2.5. PAPEL DE TLR4 DE PLAQUETAS Y CÉLULAS MIELOIDES

Los datos presentados en la presente tesis muestran que TLR4 tras isquemia experimental interviene no solo en el proceso de infiltración del neutrófilo al parénquima cerebral sino también en su polarización y/o función. En este contexto, se ha descrito que la infiltración del neutrófilo al parénquima cerebral tras la isquemia es dependiente de la interacción con la plaqueta. De hecho, existen numerosos estudios que muestran como terapias dirigidas a bloquear esta interacción presentan un efecto neuroprotector en el contexto del ictus isquémico (Goussev et al., 1998; Ishikawa et al., 2004; Sreeramkumar et al., 2014; Suzuki et al., 1999). Además la plaqueta es también capaz de modular la funcionalidad del neutrófilo. Un ejemplo característico de este proceso lo encontramos ante infecciones de tipo bacteriano. En este contexto, la unión plaqueta-neutrófilo desencadena la formación de NETs (*neutrophil extracellular traps*) como mecanismo de defensa frente a patógenos (Andonegui et al., 2005). Dado que TLR4 también se expresa en plaquetas y que estas son capaces de responder a ligandos de este receptor (Andonegui et al., 2005), decidimos comprobar si el proceso de infiltración

acelerado de neutrófilos y el papel diferencial de los mismos en los animales $TLR4^{-/-}$ era, al menos en parte, mediado por su interacción con la plaqueta o bien, inherente al propio neutrófilo. En un primer lugar, evaluamos el volumen de infarto en animales KO condicionales para TLR4 en plaquetas (animales $TLR4^{loxP/Pf4-cre}$), herramienta que nos permitió determinar de manera específica si el TLR4 plaquetario estaba implicado tanto en la función del neutrófilo como en su infiltración. Con esta estrategia, no encontramos diferencias significativas en el volumen de infarto, indicándonos que el TLR4 plaquetario no participa en el proceso de neuroprotección que observamos en los animales carentes de TLR4 a nivel constitutivo. Aunque no se muestra en la presente tesis doctoral, los datos del análisis de infiltración y polarización de neutrófilos en este grupo experimental tampoco mostraron cambios significativos, reforzando la idea de que ambos no son dependientes del receptor TLR4 plaquetario.

Dado que el TLR4 plaquetario no parecía intervenir en el proceso de infiltración y cambio fenotípico del neutrófilo, decidimos estudiar si este proceso dependía de la expresión de TLR4 en el propio neutrófilo. Para ello, generamos un segundo grupo de ratones condicionales KOs para TLR4, en este caso, en células mieloides (ratón $TLR4^{loxP/Lys-cre}$), a través de la expresión de la Cre recombinasa bajo el promotor del gen *Lys*, que codifica para la proteína lisozima M. Utilizando este modelo, nuestros resultados mostraron que los animales KOs condicionales para TLR4 en la estirpe mieloide no sólo presentaron un menor volumen de infarto sino que además mostraron, de manera similar a lo observado en los KOs constitutivos de TLR4, una mayor polarización alternativa de neutrófilos en el parénquima cerebral (presencia de neutrófilos N2), corroborando el efecto directo de TLR4 sobre el neutrófilo. Como decíamos inicialmente, este modelo elimina TLR4 en todo el linaje mieloide. Pese a esto, actualmente es la única herramienta genética disponible para realizar estudios específicos en neutrófilos maduros y formas inmaduras de los mismos (Chtanova et al., 2008; Kreisel et al., 2010), presentando el inconveniente de que este locus también se expresa en monocitos, como se ha demostrado con ratones transgénicos a través del gen reportero GFP (Faust et al., 2000). Por lo tanto, no podemos descartar que alguna parte de los efectos

neuroprotectores observados en estos ratones sean en parte dependientes de la ausencia de TLR4 en el monocito o incluso otras células del linaje mieloide, como la microglía, aunque en este tipo celular, existe muy poca recombinación (Goldmann et al., 2013). Además, hemos observado en nuestros resultados que, al eliminar los neutrófilos de los ratones TLR^{-/-} constitutivos, se incrementa dramáticamente el volumen de infarto, indicando que la ausencia del receptor TLR4 en neutrófilos es capaz de modular su infiltración y su polarización hacia un fenotipo resolutivo con capacidad neuroprotectora, lo que sugiere una contribución minoritaria de los otros tipos celulares.

2.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS N2 EN ISQUEMIA EXPERIMENTAL

Ya que nuestros resultados previos demuestran un efecto directo de TLR4 en el neutrófilo tras la isquemia experimental, decidimos hacer un estudio del análisis de expresión diferencial genómico entre las diferentes poblaciones de neutrófilos en sangre de animales isquémicos TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} con el objetivo de caracterizar el fenotipo de las poblaciones de neutrófilos (TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-}) y los mecanismos por los que los neutrófilos que no expresan TLR4 presentaban un fenotipo menos dañino o incluso beneficioso. En un primer análisis de los datos, los transcriptomas de los neutrófilos TLR4 WT y KO mostraron que se agrupan en función del genotipo de cada tipo de muestra (neutrófilos TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-}), indicando que la presencia o ausencia de TLR4 en los neutrófilos produce cambios notables en el perfil transcripcional de estas células.

Además, decidimos comprobar si existía una función asociada al conjunto de genes obtenido, y así encontramos que genes de la vía de señalización I- κ Bkinase/NF- κ B están diferencialmente expresados entre ambos genotipos de neutrófilos, algunos más expresados en TLR4^{+/+}, donde es esperable ya que TLR4 está directamente asociado con la activación de esta ruta (Alvarez et al., 2006), y otros en TLR4^{-/-}, donde hipotetizamos que se está dando algún mecanismo compensatorio de la ruta. En definitiva, este análisis demuestra que la señalización por NF- κ B está alterada cuando se manipula la expresión de TLR4 en los neutrófilos.

Uno de los principales objetivos de este análisis era identificar mecanismos de tipo funcional dependientes de TLR4 que explicasen la neuroprotección mediada por el neutrófilo. Los neutrófilos son indispensables en procesos de inflamación estéril, como es el caso del ictus (Kono and Rock, 2008). En este escenario, el neutrófilo actúa como micrófago, fagocitando células necróticas y promoviendo por tanto la resolución tejido dañado. Sin embargo, y en paralelo a este proceso resolutorio, el neutrófilo puede liberar también el contenido de sus gránulos intracelulares, un arsenal destructivo que exacerba el daño tisular (McDonald et al., 2010). Entre sus componentes se encuentran péptidos y proteasas con capacidad citotóxica como elastasas, catepsinas, gelatinasas, y mieloperoxidasas, entre otros (para revisión ver (Pham, 2006). Todas estas moléculas contribuyen a eliminar patógenos en caso de una infección pero, además, son capaces de desencadenar procesos inflamatorios no infecciosos al activar receptores específicos y modular los niveles de citoquinas proinflamatorias. A este respecto, cabe destacar que el análisis génico de los neutrófilos TLR4^{-/-} muestra un incremento en genes relacionados con la inhibición de proteasas como las estefinas 1, 2 y 3 (Stfa1, Stfa2 y Stfa3). Las estefinas, también denominadas cistatinas, se caracterizan por inhibir cisteínas-proteasas como, por ejemplo, las catepsinas, las cuales forman parte de los gránulos del neutrófilo, lo que podría sugerir una menor actividad citotóxica de los gránulos neutrofilicos en ausencia de TLR4 (Korkmaz et al., 2010). Además, otra de las cisteína proteasas inhibidas por las estefinas es la calpaína, involucrada tanto en la quimiotaxis del neutrófilo como en la muerte del mismo por apoptosis espontánea (Squier et al., 1999; Wiemer et al., 2010). Por lo tanto, aunque se necesiten estudios mecanísticos de ganancia y pérdida de función para elucidar el papel que juegan las estefinas en el fenotipo de los neutrófilos TLR4^{-/-}, los resultados de esta Tesis Doctoral apoyan fuertemente su implicación en el efecto beneficioso de este tipo celular en la isquemia cerebral.

Otra ruta interesante a destacar, y que podría aportar indicios del papel de TLR4 a nivel funcional, es la familia fosfatasa DUSP (*Dual specificity phosphatases*) cuya familia incluye 25 miembros que pueden defosforilar las MAP quinasas residuos de tirosinas así como serina-treoninas, por ello también se las conoce como MKP

(MAP quinasas fosfatasa) (Jeffrey et al., 2007). Los neutrófilos TLR4^{-/-} presentan un incremento en la expresión de estos genes (*Dusp2*, *Dusp5*, *Dusp16*), indicando que la ruta de las MAP quinasas podría estar parcialmente inhibida. En este sentido, la vía de las MAP quinasas juega un papel crucial en la señalización inflamatoria (Kyriakis and Avruch, 2012). En concreto, algunos estudios relacionan la migración diferencial del neutrófilo por genes implicados en la ruta de MAP quinasas (*p38* y *Erk*) y procesos de resolución de la inflamación con la inhibición de *Erk* (Liu et al., 2012b). Además, se ha descrito el papel de las DUSPs en el control de la respuesta inmune innata y adaptativa (Lang et al., 2006), de acuerdo con nuestros resultados y apoyando el papel de estas fosfatasa en la protección en el genotipo TLR4^{-/-}.

En definitiva, en la presente tesis doctoral hemos encontrado que el efecto neuroprotector asociado a la ausencia del receptor TLR4 es concomitante con un aumento en la población de neutrófilos infiltrantes N2, que podrían facilitar la reparación del tejido a través de mecanismos aún por confirmar, como la inhibición de la fosforilación que participa en la regulación de ciertas vías pro-inflamatorias tras isquemia, como es el caso de la vía de señalización de las MAP quinasas (Sun and Nan, 2016).

Con el fin de iniciar estudios futuros dirigidos a la detección y la caracterización de esta población de neutrófilos en la sangre de pacientes con esta patología, y establecer en ella su valor como biomarcador pronóstico, decidimos identificar marcadores de superficie, diferencialmente expresados entre ambas poblaciones, que además se expresaran en humanos y que nos permitieran concretar a qué fenotipo corresponde las poblaciones analizadas. Seleccionamos así el marcador CD38, que presenta niveles de expresión altos en la población de neutrófilos TLR4^{-/-}. Este receptor, además, está implicado en la quimiotaxis y fagocitosis de bacterias en estudios inflamatorios (Partida-Sánchez et al., 2001; Partida-Sánchez et al., 2007). Seleccionamos además CD321 o Jam-1, también implicado en migración de neutrófilos, incluso en el tejido isquémico (Cera et al., 2009; Denk et al., 2015). Nuestros resultados preliminares de citometría de flujo muestran un claro marcaje diferencial entre los neutrófilos circulantes de los ratones TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-}, lo que apoya su validez como marcadores claves para la

caracterización de un fenotipo alternativo de estas células en clínica, lo que esperamos poder validar en estudios futuros.

En resumen, nuestros datos apoyan fuertemente la implicación del receptor TLR4 sobre la modulación mieloide en la enfermedad cerebrovascular y demuestran por primera vez la existencia de neutrófilos alternativos N2 o M2-like en la isquemia cerebral experimental, dependiente de la ausencia de este receptor. La heterogeneidad de las poblaciones de neutrófilos y la capacidad de la ausencia de TLR4 para promover una entrada selectiva de estas células al tejido isquémico es un proceso novedoso para la modulación de la inflamación aguda que abre nuevas esperanzas para el tratamiento de esta patología.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El receptor TLR4 está implicado en el proceso de transformación hemorrágica asociado a la reperfusión tardía con t-PA, ya que su presencia aumenta la gravedad de la hemorragia y del área de sangrado en un modelo experimental tromboembólico *in situ*.
2. El receptor TLR4 exacerba el daño de la barrera hematoencefálica puesto que, en el cerebro de los ratones que lo expresan, se observa una mayor extravasación de la IgG y una mayor expresión de MMP-9 tras la administración tardía de t-PA.
3. Esta mayor expresión de MMP-9 en los animales con reperfusión tardía por t-PA, donde la TH es más frecuente, sugiere que el aumento de MMP9 puede ser el mecanismo implicado en el sangrado dependiente de TLR4, y apoya que MMP-9 es un marcador fiable de TH como sugiere la evidencia clínica.
4. En resumen, nuestros datos apoyan la inhibición de TLR4 como una prometedora estrategia terapéutica para prevenir la TH inducida por t-PA y así poder aumentar el número de pacientes que se pueden beneficiar de esta terapia.
5. Los animales que carecen del receptor TLR4 presentan un menor volumen de infarto que aquellos que lo expresan, y que se correlaciona con un aumento del número de neutrófilos infiltrados en el área infartada y una disminución del número de neutrófilos circulantes en sangre.
6. A los tiempos estudiados, los animales que carecen de TLR4 presentan menor microgliosis tras isquemia. Presentan además un menor número de linfocitos T y mayor de linfocitos B circulantes. Sin embargo, no muestran cambios en las poblaciones de monocitos, tanto circulantes, de medula ósea, o de aquellos que infiltran.
7. La eliminación de neutrófilos en animales con ictus produce una disminución en el tamaño de la lesión isquémica en los animales que expresan TLR4, mientras que, por el contrario, la aumentan en los animales carentes de TLR4.

8. En los animales carentes de TLR4 y tras un proceso de isquemia, se observa un aumento del número de neutrófilos alternativos con fenotipo N2 (M2-like) tanto en el cerebro isquémico como en la sangre.
9. La ausencia del receptor TLR4 en plaquetas no afecta al tamaño de la lesión isquémica pero su ausencia en células mieloides, en particular de neutrófilos, provoca una disminución en el volumen de infarto y en el fenotipo N2 de los neutrófilos que se infiltran en el parénquima.
10. Las poblaciones de neutrófilos circulantes en sangre tras isquemia experimental se pueden agrupar en dos *clusters* diferentes en función de la presencia o no del receptor TLR4, presentando al menos 100 genes con expresión diferencial entre ellos.
11. Tras isquemia experimental, los neutrófilos con ausencia del receptor TLR4 presentan un mayor marcaje de los receptores de superficie CD32 y Fr11 (CD321), que pueden ser útiles como biomarcadores de pronóstico en los pacientes con ictus. Además, presentan mayores niveles de expresión de genes que codifican para proteínas inhibidoras de proteasas (*Stfa1*, *Stfa2* y *Stfa3*) y para fosfatasas (*Dusp5*, *Dusp2*, *Dusp16*) que intervienen en la regulación de MAP quinasas, que también podrían estar implicados en los procesos de reparación.
12. En resumen, TLR4 puede modular tanto los procesos de infiltración como los cambios de fenotipo de células mieloides en la enfermedad cerebrovascular. La heterogeneidad de las poblaciones de neutrófilos y la capacidad de la ausencia de TLR4 para promover una entrada selectiva de neutrófilos N2 pro-resolutivos al tejido isquémico es un proceso novedoso para la modulación de la inflamación aguda que abre nuevas esperanzas para el tratamiento de esta patología.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. TLR4 is implicated in the haemorrhagic transformation process associated to the late reperfusion induced by t-PA administration, since its presence increases the severity of the haemorrhage and also increases the bleeding area in a in situ thromboembolic model.
2. TLR4 exacerbates the BBB damage since there is a higher extravasation of IgG and a higher expression of MMP-9 in mice that express the receptor when they receive a late administration of t-PA.
3. The increased expression of MMP-9 in animals that undergo a late reperfusion by t-PA, where HT is more likely to occur, suggests that the MMP-9 increase may be the mechanism implicated in the bleeding process dependent of TLR4 and supports the idea that MMP-9 is a reliable HT marker as the clinical evidences support.
4. In summary, our data supports that the inhibition of TLR4 is a promising therapeutic strategy to prevent HT induced by t-PA and consequently it would be able to increase the number of patients that may benefit from this therapy.
5. TLR4 deficient mice present a smaller infarct volume in comparison with those who express the receptor and that correlates with an increase of the infiltrated number of neutrophils in the infarcted area and a decrease of the number of blood circulating neutrophils.
6. At the studied time points, TLR4 deficient animals present less microgliosis after ischemia. They also present a lower number of T lymphocytes and a higher number of B lymphocytes in blood. However, there are no changes in monocytes populations, both circulating from the bone marrow and those who infiltrate.
7. The neutrophil elimination in ischemic animals induce a decrease in the ischemic lesion size if studied in animals that express TLR4, on the contrary the infarct size increases in TLR4 deficient animals.

8. In TLR4 deficient animals that have suffered an ischemic process, there is an increase number of alternative neutrophils that express the N2 phenotype (M2-like) both in those who are in the ischemic brain and in the blood.
9. TLR4 deficiency in platelets does not affect the ischemic lesion size but its deficiency in myeloid cells, neutrophils in particular, induce a decrease in the infarct volume and in the N2 neutrophil phenotype in those who infiltrate the parenchyma.
10. The neutrophil populations present in blood after the experimental ischemia can be classified in two different clusters depending on the TLR4 presence or absence, showing at least 100 genes with differential expression between them.
11. After experimental ischemia, TLR4 deficient neutrophils present a higher labelling of CD32 surface receptors and Fr11 (CD321) that may be useful as prognostic biomarkers in stroke patients. In addition, they present higher expression levels of genes that codify for protease inhibitors proteins (*Stfa1*, *Stfa2* y *Stfa3*) and phosphatases (*Dusp5*, *Dusp2*, *Dusp16*) which participate in the MAP kinases regulation that also may be implicated in the repairing processes.
12. In summary, TLR4 can modulate both infiltration processes and phenotype changes of myeloid cells in the neurovascular disease. The heterogeneity of neutrophil populations and the ability of the TLR4 absence to promote a selective entry of N2 pro-resolutive neutrophils to the ischemic tissue is a novel process to modulate the acute infiltration that creates new hopes for the treatment of this pathology.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1988. The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators. *J Clin Epidemiol.* 41, 105-14.
1995. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med.* 333, 1581-7.
- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 7, 41-53.
- Abbott, N.J., et al., 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 37, 13-25.
- Aderem, A., Ulevitch, R.J., 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 406, 782-7.
- Adibhatla, R.M., Hatcher, J.F., 2008. Tissue plasminogen activator (tPA) and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of stroke: therapeutic strategies. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 7, 243-53.
- Akira, S., Takeda, K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 4, 499-511.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 124, 783-801.
- Akopov, S.E., Simonian, N.A., Grigorian, G.S., 1996. Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. *Stroke.* 27, 1739-43.
- al-Essa, L.Y., et al., 1995. Heterogeneity of circulating and exudated polymorphonuclear leukocytes in superoxide-generating response to cyclic AMP and cyclic AMP-elevating agents. Investigation of the underlying mechanism. *Biochem Pharmacol.* 49, 315-22.
- Albers, G.W., et al., 2002. ATLANTIS trial: results for patients treated within 3 hours of stroke onset. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke. *Stroke.* 33, 493-5.
- Albers, G.W., et al., 2011. Stroke Treatment Academic Industry Roundtable (STAIR) recommendations for maximizing the use of intravenous thrombolytics and expanding treatment options with intra-arterial and neuroprotective therapies. *Stroke.* 42, 2645-50.
- Alonso-Lebrero, J.L., et al., 2000. Polarization and interaction of adhesion molecules P-selectin glycoprotein ligand 1 and intercellular adhesion molecule 3 with moesin and ezrin in myeloid cells. *Blood.* 95, 2413-9.
- Alvarez, M.E., et al., 2006. Neutrophil signaling pathways activated by bacterial DNA stimulation. *J Immunol.* 177, 4037-46.
- Amantea, D., et al., 2014. Understanding the multifaceted role of inflammatory mediators in ischemic stroke. *Curr Med Chem.* 21, 2098-117.
- Ames, A., et al., 1968. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol.* 52, 437-53.
- Andonegui, G., et al., 2005. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood.* 106, 2417-23.
- Armulik, A., Abramsson, A., Betsholtz, C., 2005. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res.* 97, 512-23.
- Arnould, M.C., et al., 2004. Comparison of CT and three MR sequences for detecting and categorizing early (48 hours) hemorrhagic transformation in hyperacute ischemic stroke. *AJNR Am J Neuroradiol.* 25, 939-44.

- Arslan, F., et al., 2010. Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. *Circulation*. 121, 80-90.
- Asahi, M., et al., 2000. Reduction of tissue plasminogen activator-induced hemorrhage and brain injury by free radical spin trapping after embolic focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 20, 452-7.
- Astrup, J., Siesjö, B.K., Symon, L., 1981. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*. 12, 723-5.
- Ballesteros, I., et al., 2014a. Stereological and flow cytometry characterization of leukocyte subpopulations in models of transient or permanent cerebral ischemia. *J Vis Exp*.
- Ballesteros, I., et al., 2014b. Rosiglitazone-induced CD36 up-regulation resolves inflammation by PPAR γ and 5-LO-dependent pathways. *J Leukoc Biol*. 95, 587-98.
- Bar-Shavit, Z., 2008. Taking a toll on the bones: regulation of bone metabolism by innate immune regulators. *Autoimmunity*. 41, 195-203.
- Baron, J.C., 2001. Perfusion thresholds in human cerebral ischemia: historical perspective and therapeutic implications. *Cerebrovasc Dis*. 11 Suppl 1, 2-8.
- Barreiro, O., et al., 2007. Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol Rev*. 218, 147-64.
- Becker, K.J., 2009. Sensitization and tolerization to brain antigens in stroke. *Neuroscience*. 158, 1090-7.
- Bejot, Y., et al., 2008. Ischaemic stroke subtypes and associated risk factors: a French population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 79, 1344-8.
- Benchenane, K., et al., 2005. Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation*. 111, 2241-9.
- Berkhemer, O.A., et al., 2015. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 372, 11-20.
- Berthet, J., et al., 2010. Toll-like receptor 4 signal transduction in platelets: novel pathways. *Br J Haematol*. 151, 89-92.
- Beutler, B., et al., 2007. Genetic analysis of resistance to viral infection. *Nat Rev Immunol*. 7, 753-66.
- Bode, J.G., Ehrling, C., Häussinger, D., 2012. The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. *Cell Signal*. 24, 1185-94.
- Bolton, S.J., Anthony, D.C., Perry, V.H., 1998. Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience*. 86, 1245-57.
- Borregaard, N., Sørensen, O.E., Theilgaard-Mönch, K., 2007. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol*. 28, 340-5.
- Borregaard, N., 2010. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 33, 657-70.
- Brea, D., et al., 2011. Toll-like receptors 2 and 4 in ischemic stroke: outcome and therapeutic values. *J Cereb Blood Flow Metab*. 31, 1424-31.
- Brinkmann, V., et al., 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 303, 1532-5.
- Broderick, J.P., et al., 2013. Endovascular therapy after intravenous t-PA versus t-PA alone for stroke. *N Engl J Med*. 368, 893-903.
- Brouns, R., De Deyn, P.P., 2009. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg*. 111, 483-95.
- Bsibsi, M., et al., 2002. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 61, 1013-21.
- Buchanan, M.M., et al., 2010. Toll-like receptor 4 in CNS pathologies. *J Neurochem*. 114, 13-27.

- Buck, B.H., et al., 2008. Early neutrophilia is associated with volume of ischemic tissue in acute stroke. *Stroke*. 39, 355-60.
- Cai, W., et al., 2017. Pericytes in Brain Injury and Repair After Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res*. 8, 107-121.
- Campanella, M., et al., 2002. Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. *Stroke*. 33, 586-92.
- Campbell, B.C., et al., 2015. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med*. 372, 1009-18.
- Cao, C.X., et al., 2007. Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 353, 509-14.
- Cao, Z., et al., 1996. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*. 383, 443-6.
- Caplan, L.R., 2011. Stroke classification: a personal view. *Stroke*. 42, S3-6.
- Carandang, R., et al., 2006. Trends in incidence, lifetime risk, severity, and 30-day mortality of stroke over the past 50 years. *JAMA*. 296, 2939-46.
- Carter, R.J., et al., 1999. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci*. 19, 3248-57.
- Carty, M., Bowie, A.G., 2011. Evaluating the role of Toll-like receptors in diseases of the central nervous system. *Biochem Pharmacol*. 81, 825-37.
- Caso, J.R., et al., 2007. Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation*. 115, 1599-608.
- Castellanos, M., et al., 2003. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke*. 34, 40-6.
- Castellanos, M., et al., 2007. Serum cellular fibronectin and matrix metalloproteinase-9 as screening biomarkers for the prediction of parenchymal hematoma after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke: a multicenter confirmatory study. *Stroke*. 38, 1855-9.
- Cera, M.R., et al., 2009. JAM-A promotes neutrophil chemotaxis by controlling integrin internalization and recycling. *J Cell Sci*. 122, 268-77.
- Cesarman-Maus, G., Hajjar, K.A., 2005. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol*. 129, 307-21.
- Chakravarti, A., et al., 2009. Reprogramming of a subpopulation of human blood neutrophils by prolonged exposure to cytokines. *Lab Invest*. 89, 1084-99.
- Chamorro, Á., et al., 2012. The immunology of acute stroke. *Nat Rev Neurol*. 8, 401-10.
- Chamorro, Á., et al., 2016. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol*. 15, 869-81.
- Chan, P.H., et al., 1984. Brain injury, edema, and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology*. 34, 315-20.
- Chang, D.I., et al., 2003. Activation systems for latent matrix metalloproteinase-2 are upregulated immediately after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 23, 1408-19.
- Chen, H., Song, Y.S., Chan, P.H., 2009. Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 29, 1262-72.
- Chen, M., et al., 2008. Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance. *Stroke*. 39, 3042-8.
- Chen, P.H., et al., 2012. Classifying Ischemic Stroke, from TOAST to CISS. *CNS Neurosci Ther*. 18, 452-6.
- Chen, S.T., et al., 1986. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke*. 17, 738-43.
- Chen, Z.L., Strickland, S., 1997. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell*. 91, 917-25.
- Cheng, Y.D., Al-Khoury, L., Zivin, J.A., 2004. Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *NeuroRx*. 1, 36-45.

- Cherry, J.D., Olschowka, J.A., O'Banion, M.K., 2014. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*. 11, 98.
- Choi, D.W., 1988a. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. 1, 623-34.
- Choi, D.W., 1988b. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci*. 11, 465-9.
- Chtanova, T., et al., 2008. Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. *Immunity*. 29, 487-96.
- Chu, H.X., et al., 2015. Evidence That Ly6C(hi) Monocytes are Protective in Acute Ischemic Stroke by Promoting M2 Macrophage Polarization. *Stroke*. 46, 1929-37.
- Chuang, T.H., Ulevitch, R.J., 2004. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 5, 495-502.
- Ciccone, A., Valvassori, L., Investigators, S.E., 2013. Endovascular treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 368, 2433-4.
- Clark, W.M., et al., 1999. Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke. *JAMA*. 282, 2019-26.
- Cognasse, F., et al., 2015. The Inflammatory Role of Platelets via Their TLRs and Siglec Receptors. *Front Immunol*. 6, 83.
- Cohen, J.E., et al., 2011. State-of-the-art reperfusion strategies for acute ischemic stroke. *J Clin Neurosci*. 18, 319-23.
- Colotta, F., et al., 1992. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*. 80, 2012-20.
- Connolly, E.S., et al., 1997. Exacerbation of cerebral injury in mice that express the P-selectin gene: identification of P-selectin blockade as a new target for the treatment of stroke. *Circ Res*. 81, 304-10.
- Copin, J.C., et al., 2011. Recombinant tissue plasminogen activator induces blood-brain barrier breakdown by a matrix metalloproteinase-9-independent pathway after transient focal cerebral ischemia in mouse. *Eur J Neurosci*. 34, 1085-92.
- Courties, G., Moskowitz, M.A., Nahrendorf, M., 2014. The innate immune system after ischemic injury: lessons to be learned from the heart and brain. *JAMA Neurol*. 71, 233-6.
- Crumrine, R.C., et al., 2011. Intra-arterial administration of recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) causes more intracranial bleeding than does intravenous rt-PA in a transient rat middle cerebral artery occlusion model. *Exp Transl Stroke Med*. 3, 10.
- Cuadrado, E., et al., 2008. Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J Leukoc Biol*. 84, 207-14.
- Cuartero, M.I., et al., 2013. N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: modulation by the PPAR γ agonist rosiglitazone. *Stroke*. 44, 3498-508.
- Cuartero, M.I., et al., 2015. Complexity of the cell-cell interactions in the innate immune response after cerebral ischemia. *Brain Res*. 1623, 53-62.
- Cuartero, M.I., et al., 2016. The Kynurenine Pathway in the Acute and Chronic Phases of Cerebral Ischemia. *Curr Pharm Des*. 22, 1060-73.
- D'Mello, C., Le, T., Swain, M.G., 2009. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor α signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci*. 29, 2089-102.
- da Silva Correia, J., et al., 2001. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem*. 276, 21129-35.

- Daley, J.M., et al., 2008. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol.* 83, 64-70.
- Dalli, J., et al., 2008. Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood.* 112, 2512-9.
- Dange, R.B., et al., 2014. Central blockade of TLR4 improves cardiac function and attenuates myocardial inflammation in angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovasc Res.* 103, 17-27.
- Davalos, D., et al., 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 8, 752-8.
- De Santo, C., et al., 2010. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat Immunol.* 11, 1039-46.
- del Zoppo, G.J., Mabuchi, T., 2003. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23, 879-94.
- del Zoppo, G.J., 2006. Stroke and neurovascular protection. *N Engl J Med.* 354, 553-5.
- del Zoppo, G.J., et al., 2007. Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia. *Stroke.* 38, 646-51.
- del Zoppo, G.J., 2010. Acute anti-inflammatory approaches to ischemic stroke. *Ann N Y Acad Sci.* 1207, 143-8.
- Delaney, J.R., et al., 2006. Cooperative control of Drosophila immune responses by the JNK and NF-kappaB signaling pathways. *EMBO J.* 25, 3068-77.
- Demir, R., et al., 2012. Relationship between plasma metalloproteinase-9 levels and volume and severity of infarct in patients with acute ischemic stroke. *Acta Neurol Belg.* 112, 351-6.
- Denes, A., et al., 2007. Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27, 1941-53.
- Denes, A., et al., 2011. Experimental stroke-induced changes in the bone marrow reveal complex regulation of leukocyte responses. *J Cereb Blood Flow Metab.* 31, 1036-50.
- Denk, S., et al., 2015. Early Detection of Junctional Adhesion Molecule-1 (JAM-1) in the Circulation after Experimental and Clinical Polytrauma. *Mediators Inflamm.* 2015, 463950.
- Dimitrijevic, O.B., et al., 2007. Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Stroke.* 38, 1345-53.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M.A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22, 391-7.
- Divanovic, S., et al., 2005. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat Immunol.* 6, 571-8.
- Donovan, F.M., et al., 1997. Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J Neurosci.* 17, 5316-26.
- Dore-Duffy, P., LaManna, J.C., 2007. Physiologic angiodynamics in the brain. *Antioxid Redox Signal.* 9, 1363-71.
- Durand, A., et al., 2012. Spontaneous reperfusion after in situ thromboembolic stroke in mice. *PLoS One.* 7, e50083.
- Durukan, A., Tatlisumak, T., 2007. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav.* 87, 179-97.
- Dávalos, A., 2005. Thrombolysis in acute ischemic stroke: successes, failures, and new hopes. *Cerebrovasc Dis.* 20 Suppl 2, 135-9.
- ElAli, A., et al., 2011. Increased blood-brain barrier permeability and brain edema after focal cerebral ischemia induced by hyperlipidemia: role of lipid peroxidation and calpain-1/2, matrix metalloproteinase-2/9, and RhoA overactivation. *Stroke.* 42, 3238-44.

- Emsley, H.C., et al., 2003. An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *J Neuroimmunol.* 139, 93-101.
- Enzmann, G., et al., 2013. The neurovascular unit as a selective barrier to polymorphonuclear granulocyte (PMN) infiltration into the brain after ischemic injury. *Acta Neuropathol.* 125, 395-412.
- Fadakar, K., et al., 2014. The role of Toll-like receptors (TLRs) in stroke. *Rev Neurosci.* 25, 699-712.
- Fang, H., et al., 2013. Toll-like receptor 4 signaling in intracerebral hemorrhage-induced inflammation and injury. *J Neuroinflammation.* 10, 27.
- Faust, N., et al., 2000. Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood.* 96, 719-26.
- Faustino, J.V., et al., 2011. Microglial cells contribute to endogenous brain defenses after acute neonatal focal stroke. *J Neurosci.* 31, 12992-3001.
- Felger, J.C., et al., 2010. Brain dendritic cells in ischemic stroke: time course, activation state, and origin. *Brain Behav Immun.* 24, 724-37.
- Fiorelli, M., et al., 1999. Hemorrhagic transformation within 36 hours of a cerebral infarct: relationships with early clinical deterioration and 3-month outcome in the European Cooperative Acute Stroke Study I (ECASS I) cohort. *Stroke.* 30, 2280-4.
- Fisher, M., Schaebitz, W., 2000. An overview of acute stroke therapy: past, present, and future. *Arch Intern Med.* 160, 3196-206.
- Fisher, M., Roundtable, S.T.A.I., 2003. Recommendations for advancing development of acute stroke therapies: Stroke Therapy Academic Industry Roundtable 3. *Stroke.* 34, 1539-46.
- Fisher, M., 2009. Pericyte signaling in the neurovascular unit. *Stroke.* 40, S13-5.
- Fisher, M., et al., 2009. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke.* 40, 2244-50.
- Fisher, M., Albers, G.W., 2013. Advanced imaging to extend the therapeutic time window of acute ischemic stroke. *Ann Neurol.* 73, 4-9.
- Francklin, K.B.J., Paxinos, G., 2007. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* Vol., ed.^eds.
- Frank, B., et al., 2013. Thrombolysis in stroke despite contraindications or warnings? *Stroke.* 44, 727-33.
- Fraser, P.A., 2011. The role of free radical generation in increasing cerebrovascular permeability. *Free Radic Biol Med.* 51, 967-77.
- Fridlender, Z.G., et al., 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell.* 16, 183-94.
- Fujihara, M., et al., 2003. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther.* 100, 171-94.
- Furlan, A., et al., 1999. Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study: a randomized controlled trial. *Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism.* *JAMA.* 282, 2003-11.
- Garcia-Bonilla, L., et al., 2014. Inducible nitric oxide synthase in neutrophils and endothelium contributes to ischemic brain injury in mice. *J Immunol.* 193, 2531-7.
- García-Yébenes, I., et al., 2011. A mouse model of hemorrhagic transformation by delayed tissue plasminogen activator administration after in situ thromboembolic stroke. *Stroke.* 42, 196-203.
- Geering, B., Simon, H.U., 2011. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ.* 18, 1457-69.
- Gelderblom, M., et al., 2009. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke.* 40, 1849-57.

- Gesuite, R., Kohama, S.G., Stenzel-Poore, M.P., 2014. Toll-like receptors and ischemic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* 73, 378-86.
- Gidday, J.M., et al., 2005. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289, H558-68.
- Ginsberg, M.D., Pulsinelli, W.A., 1994. The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. *Ann Neurol.* 36, 553-4.
- Gladstone, D.J., et al., 2002. Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke.* 33, 2123-36.
- Gliem, M., et al., 2012. Macrophages prevent hemorrhagic infarct transformation in murine stroke models. *Ann Neurol.* 71, 743-52.
- Goldmann, T., et al., 2013. A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation. *Nat Neurosci.* 16, 1618-26.
- Gordon, S., Martinez, F.O., 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 32, 593-604.
- Gorina, R., et al., 2011. Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NF κ B signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia.* 59, 242-55.
- Goussev, A.V., et al., 1998. P-selectin antibody reduces hemorrhage and infarct volume resulting from MCA occlusion in the rat. *J Neurol Sci.* 161, 16-22.
- Goyal, M., et al., 2015. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med.* 372, 1019-30.
- Goyal, M., et al., 2016. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet.* 387, 1723-31.
- Graham, C.A., et al., 2012. Matrix metalloproteinase 9 mRNA: an early prognostic marker for patients with acute stroke. *Clin Biochem.* 45, 352-5.
- Grønberg, N.V., et al., 2013. Leukocyte infiltration in experimental stroke. *J Neuroinflammation.* 10, 115.
- Gu, L., et al., 2015. T Cells and Cerebral Ischemic Stroke. *Neurochem Res.* 40, 1786-91.
- Gualandris, A., et al., 1996. Membrane depolarization induces calcium-dependent secretion of tissue plasminogen activator. *J Neurosci.* 16, 2220-5.
- Gundersen, H.J., et al., 1988. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 96, 857-81.
- Gursoy-Ozdemir, Y., et al., 2004. Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9. *J Clin Invest.* 113, 1447-55.
- Hacke, W., et al., 1995. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA.* 274, 1017-25.
- Hacke, W., et al., 1998. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet.* 352, 1245-51.
- Hacke, W., et al., 2004. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet.* 363, 768-74.
- Hacke, W., et al., 2008. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 359, 1317-29.
- Hamel, E., 2006. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol (1985).* 100, 1059-64.
- Hansen, A.J., 1985. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev.* 65, 101-48.

- Haorah, J., et al., 2007. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem.* 101, 566-76.
- Harada, K., et al., 2012. Combination of reactive oxygen species and tissue-type plasminogen activator enhances the induction of gelatinase B in brain endothelial cells. *Int J Neurosci.* 122, 53-9.
- Harbord, M., et al., 2002. Ym1 is a neutrophil granule protein that crystallizes in p47phox-deficient mice. *J Biol Chem.* 277, 5468-75.
- Harris, A.K., et al., 2005. Effect of neutrophil depletion on gelatinase expression, edema formation and hemorrhagic transformation after focal ischemic stroke. *BMC Neurosci.* 6, 49.
- Harston, G.W., et al., 2010. The contribution of L-arginine to the neurotoxicity of recombinant tissue plasminogen activator following cerebral ischemia: a review of rtPA neurotoxicity. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30, 1804-16.
- Hashimoto, C., Hudson, K.L., Anderson, K.V., 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell.* 52, 269-79.
- Hawkins, B.T., Davis, T.P., 2005. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 57, 173-85.
- Hernández-Jiménez, M., et al., 2013. Silent information regulator 1 protects the brain against cerebral ischemic damage. *Stroke.* 44, 2333-7.
- Hernández-Jiménez, M., et al., 2017. Test repositioning for functional assessment of neurological outcome after experimental stroke in mice. Vol., ed.^eds., Plos ONE.
- Hill, J., et al., 2014. Emerging roles of pericytes in the regulation of the neurovascular unit in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol.* 9, 591-605.
- Ho, W.M., et al., 2016. Pharmacological Management Options to Prevent and Reduce Ischemic Hemorrhagic Transformation. *Curr Drug Targets.*
- Holmin, S., Mathiesen, T., 2000. Intracerebral administration of interleukin-1 β and induction of inflammation, apoptosis, and vasogenic edema. *J Neurosurg.* 92, 108-20.
- Hong, C., et al., 2012. Coordinate regulation of neutrophil homeostasis by liver X receptors in mice. *J Clin Invest.* 122, 337-47.
- Hornig, C.R., Dorndorf, W., Agnoli, A.L., 1986. Hemorrhagic cerebral infarction--a prospective study. *Stroke.* 17, 179-85.
- Hosomi, N., et al., 2005. Tumor necrosis factor- α neutralization reduced cerebral edema through inhibition of matrix metalloproteinase production after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25, 959-67.
- Hossmann, K.A., 1994. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol.* 36, 557-65.
- Hossmann, K.A., 2009. Pathophysiological basis of translational stroke research. *Folia Neuropathol.* 47, 213-27.
- Hossmann, K.A., 2012. The two pathophysiologies of focal brain ischemia: implications for translational stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab.* 32, 1310-6.
- Hu, Q., et al., 2011. Isoflurane enhanced hemorrhagic transformation by impairing antioxidant enzymes in hyperglycemic rats with middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 42, 1750-6.
- Hu, X., et al., 2012. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 43, 3063-70.
- Hu, X., et al., 2013. The role of acetylation in TLR4-mediated innate immune responses. *Immunol Cell Biol.* 91, 611-4.
- Hung, S.I., et al., 2002. Transient expression of Ym1, a heparin-binding lectin, during developmental hematopoiesis and inflammation. *J Leukoc Biol.* 72, 72-82.

- Hurn, P.D., et al., 2007. T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27, 1798-805.
- Husebye, H., et al., 2006. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J.* 25, 683-92.
- Hyakkoku, K., et al., 2010. Toll-like receptor 4 (TLR4), but not TLR3 or TLR9, knock-out mice have neuroprotective effects against focal cerebral ischemia. *Neuroscience.* 171, 258-67.
- Hyun, J., Kanagavelu, S., Fukata, M., 2013. A unique host defense pathway: TRIF mediates both antiviral and antibacterial immune responses. *Microbes Infect.* 15, 1-10.
- Häger, M., Cowland, J.B., Borregaard, N., 2010. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med.* 268, 25-34.
- Iadecola, C., Anrather, J., 2011. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med.* 17, 796-808.
- Ihle-Hansen, H., et al., 2012. Risk factors for and incidence of subtypes of ischemic stroke. *Funct Neurol.* 27, 35-40.
- Ikegame, Y., et al., 2010. Neutrophil elastase inhibitor prevents ischemic brain damage via reduction of vasogenic edema. *Hypertens Res.* 33, 703-7.
- Inzitari, D., et al., 2013. MMP9 variation after thrombolysis is associated with hemorrhagic transformation of lesion and death. *Stroke.* 44, 2901-3.
- Ishikawa, M., et al., 2004. Platelet-leukocyte-endothelial cell interactions after middle cerebral artery occlusion and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 24, 907-15.
- Iwasaki, A., Medzhitov, R., 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 5, 987-95.
- Jeffrey, K.L., et al., 2007. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov.* 6, 391-403.
- Jin, R., Yang, G., Li, G., 2010a. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol.* 87, 779-89.
- Jin, R., Yang, G., Li, G., 2010b. Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiol Dis.* 38, 376-85.
- Jou, I., et al., 2006. Gangliosides trigger inflammatory responses via TLR4 in brain glia. *Am J Pathol.* 168, 1619-30.
- Jovin, T.G., et al., 2015. Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N Engl J Med.* 372, 2296-306.
- Justicia, C., et al., 2003. Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23, 1430-40.
- Kagan, J.C., et al., 2008. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol.* 9, 361-8.
- Kamel, H., Iadecola, C., 2012. Brain-immune interactions and ischemic stroke: clinical implications. *Arch Neurol.* 69, 576-81.
- Katsura, K., Kristián, T., Siesjö, B.K., 1994. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans.* 22, 991-6.
- Kaur, J., et al., 2004. The neurotoxicity of tissue plasminogen activator? *J Cereb Blood Flow Metab.* 24, 945-63.
- Kawai, T., Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 11, 373-84.
- Khatri, P., Wechsler, L.R., Broderick, J.P., 2007. Intracranial hemorrhage associated with revascularization therapies. *Stroke.* 38, 431-40.
- Kidwell, C.S., et al., 2001. Trends in acute ischemic stroke trials through the 20th century. *Stroke.* 32, 1349-59.

- Kidwell, C.S., et al., 2013. A trial of imaging selection and endovascular treatment for ischemic stroke. *N Engl J Med.* 368, 914-23.
- Kierdorf, K., Prinz, M., 2013. Factors regulating microglia activation. *Front Cell Neurosci.* 7, 44.
- Kigerl, K.A., et al., 2007. Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 regulate inflammation, gliosis, and myelin sparing after spinal cord injury. *J Neurochem.* 102, 37-50.
- Kim, E., et al., 2014. Role of spleen-derived monocytes/macrophages in acute ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 34, 1411-9.
- Kim, J.V., et al., 2009. Myelomonocytic cell recruitment causes fatal CNS vascular injury during acute viral meningitis. *Nature.* 457, 191-5.
- Kim, K.H., Son, S.M., Mook-Jung, I., 2013. Contributions of microglia to structural synaptic plasticity. *J Exp Neurosci.* 7, 85-91.
- Kim, M.H., et al., 2011. Neutrophil survival and c-kit(+)-progenitor proliferation in *Staphylococcus aureus*-infected skin wounds promote resolution. *Blood.* 117, 3343-52.
- Koehler, R.C., Gebremedhin, D., Harder, D.R., 2006. Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J Appl Physiol* (1985). 100, 307-17.
- Kolaczowska, E., Kubes, P., 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 13, 159-75.
- Kolominsky-Rabas, P.L., et al., 2001. Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study. *Stroke.* 32, 2735-40.
- Kondo, T., Kawai, T., Akira, S., 2012. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol.* 33, 449-58.
- Kono, H., Rock, K.L., 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* 8, 279-89.
- Konstantinov, I.E., et al., 2004. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics.* 19, 143-50.
- Kontos, C.D., et al., 1992. Cytochemical detection of superoxide in cerebral inflammation and ischemia in vivo. *Am J Physiol.* 263, H1234-42.
- Kontos, H.A., 1985. George E. Brown memorial lecture. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ Res.* 57, 508-16.
- Korkmaz, B., et al., 2010. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol Rev.* 62, 726-59.
- Kostulas, N., et al., 2002. Dendritic cells are present in ischemic brain after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke.* 33, 1129-34.
- Kreisel, D., et al., 2010. In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 18073-8.
- Kriz, J., 2006. Inflammation in ischemic brain injury: timing is important. *Crit Rev Neurobiol.* 18, 145-57.
- Krizanac-Bengez, L., et al., 2006. Loss of flow induces leukocyte-mediated MMP/TIMP imbalance in dynamic in vitro blood-brain barrier model: role of pro-inflammatory cytokines. *Am J Physiol Cell Physiol.* 291, C740-9.
- Kudo, M., et al., 1982. An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke.* 13, 505-8.
- Kyriakis, J.M., Avruch, J., 2012. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev.* 92, 689-737.
- Lacroix, S., Feinstein, D., Rivest, S., 1998. The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathol.* 8, 625-40.

- Laflamme, N., Rivest, S., 2001. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J.* 15, 155-163.
- Lai, A.Y., Todd, K.G., 2006. Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. *Can J Physiol Pharmacol.* 84, 49-59.
- Laird, M.D., et al., 2014. High mobility group box protein-1 promotes cerebral edema after traumatic brain injury via activation of toll-like receptor 4. *Glia.* 62, 26-38.
- Lalancette-Hébert, M., et al., 2007. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci.* 27, 2596-605.
- Lang, R., Hammer, M., Mages, J., 2006. DUSP meet immunology: dual specificity MAPK phosphatases in control of the inflammatory response. *J Immunol.* 177, 7497-504.
- Langhauser, F., et al., 2014. Blocking of $\alpha 4$ integrin does not protect from acute ischemic stroke in mice. *Stroke.* 45, 1799-806.
- Larrue, V., et al., 1997. Hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. Potential contributing factors in the European Cooperative Acute Stroke Study. *Stroke.* 28, 957-60.
- Larrue, V., et al., 2001. Risk factors for severe hemorrhagic transformation in ischemic stroke patients treated with recombinant tissue plasminogen activator: a secondary analysis of the European-Australasian Acute Stroke Study (ECASS II). *Stroke.* 32, 438-41.
- Lehnardt, S., et al., 2002. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci.* 22, 2478-86.
- Lehnardt, S., et al., 2003. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 8514-9.
- Lemaitre, B., et al., 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 86, 973-83.
- Leow-Dyke, S., et al., 2012. Neuronal Toll-like receptor 4 signaling induces brain endothelial activation and neutrophil transmigration in vitro. *J Neuroinflammation.* 9, 230.
- Leto, T.L., Geiszt, M., 2006. Role of Nox family NADPH oxidases in host defense. *Antioxid Redox Signal.* 8, 1549-61.
- Ley, K., et al., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 7, 678-89.
- Li, P., et al., 2014. Essential role of program death 1-ligand 1 in regulatory T-cell-afforded protection against blood-brain barrier damage after stroke. *Stroke.* 45, 857-64.
- Liesz, A., et al., 2009. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med.* 15, 192-9.
- Liew, F.Y., 2002. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nat Rev Immunol.* 2, 55-60.
- Lijnen, H.R., 2001. Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci.* 936, 226-36.
- Lin, S., et al., 2012. Heme activates TLR4-mediated inflammatory injury via MyD88/TRIF signaling pathway in intracerebral hemorrhage. *J Neuroinflammation.* 9, 46.
- Liu, S., et al., 2012a. The role of pericytes in blood-brain barrier function and stroke. *Curr Pharm Des.* 18, 3653-62.
- Liu, X., et al., 2012b. Bidirectional regulation of neutrophil migration by mitogen-activated protein kinases. *Nat Immunol.* 13, 457-64.
- Lo, E.H., Broderick, J.P., Moskowitz, M.A., 2004. tPA and proteolysis in the neurovascular unit. *Stroke.* 35, 354-6.
- Lo, E.H., 2008. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med.* 14, 497-500.
- Love, S., 1999. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.* 9, 119-31.

- Lozano, R., et al., 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 380, 2095-128.
- Lu, A., et al., 2013. Matrix metalloproteinase-2 deletions protect against hemorrhagic transformation after 1 h of cerebral ischemia and 23 h of reperfusion. *Neuroscience*. 253, 361-7.
- Ludewig, P., et al., 2013. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 inhibits MMP-9-mediated blood-brain-barrier breakdown in a mouse model for ischemic stroke. *Circ Res*. 113, 1013-22.
- Ludewig, P., et al., 2016. Dendritic cells in brain diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1862, 352-67.
- Ma, Y., et al., 2007. TLR8: an innate immune receptor in brain, neurons and axons. *Cell Cycle*. 6, 2859-68.
- Macrez, R., et al., 2011. Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *Lancet Neurol*. 10, 471-80.
- Maes, M., et al., 2011. Somatization, but not depression, is characterized by disorders in the tryptophan catabolite (TRYCAT) pathway, indicating increased indoleamine 2,3-dioxygenase and lowered kynurenine aminotransferase activity. *Neuro Endocrinol Lett*. 32, 264-73.
- Mallard, C., 2012. Innate immune regulation by toll-like receptors in the brain. *ISRN Neurol*. 2012, 701950.
- Manavalan, B., Basith, S., Choi, S., 2011. Similar Structures but Different Roles - An Updated Perspective on TLR Structures. *Front Physiol*. 2, 41.
- Mantovani, A., et al., 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 25, 677-86.
- Mantovani, A., Sica, A., Locati, M., 2005. Macrophage polarization comes of age. *Immunity*. 23, 344-6.
- Mantovani, A., et al., 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 11, 519-31.
- Martin, L.J., et al., 1998. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull*. 46, 281-309.
- Martin, R.L., Lloyd, H.G., Cowan, A.I., 1994. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci*. 17, 251-7.
- Martz, D., et al., 1989. Allopurinol and dimethylthiourea reduce brain infarction following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 20, 488-94.
- Matsuno, H., et al., 1993. A simple and reproducible cerebral thrombosis model in rats induced by a photochemical reaction and the effect of a plasminogen-plasminogen activator chimera in this model. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 29, 165-73.
- McArthur, K.S., et al., 2011. Diagnosis and management of transient ischaemic attack and ischaemic stroke in the acute phase. *BMJ*. 342, d1938.
- McColl, B.W., Rothwell, N.J., Allan, S.M., 2008. Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice. *J Neurosci*. 28, 9451-62.
- McColl, B.W., et al., 2010. Increased brain microvascular MMP-9 and incidence of haemorrhagic transformation in obese mice after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 30, 267-72.
- McDonald, B., et al., 2010. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*. 330, 362-6.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A., 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 388, 394-7.

- Medzhitov, R., 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 449, 819-26.
- Melchor, J.P., Strickland, S., 2005. Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb Haemost.* 93, 655-60.
- Meretoja, A., et al., 2011. Trends in treatment and outcome of stroke patients in Finland from 1999 to 2007. PERFECT Stroke, a nationwide register study. *Ann Med.* 43 Suppl 1, S22-30.
- Mestas, J., Hughes, C.C., 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 172, 2731-8.
- Mildner, A., et al., 2007. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci.* 10, 1544-53.
- Minnerup, J., et al., 2012. Neuroprotection for stroke: current status and future perspectives. *Int J Mol Sci.* 13, 11753-72.
- Miró-Mur, F., et al., 2016. Antigen Presentation After Stroke. *Neurotherapeutics.* 13, 719-728.
- Moalem, G., et al., 1999. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med.* 5, 49-55.
- Molina, C.A., Alvarez-Sabín, J., 2009. Recanalization and reperfusion therapies for acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 27 Suppl 1, 162-7.
- Mollen, K.P., et al., 2006. Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock.* 26, 430-7.
- Moraga, A., 2014. Implicación de TLR4 en la neurorreparación tras ictus isquémico experimental. In: Departamento de Farmacología. Universidad Complutense de Madrid, <http://eprints.ucm.es/33061/1/T36366.pdf>, pp. 164.
- Moraga, A., et al., 2014. Toll-like receptor 4 modulates cell migration and cortical neurogenesis after focal cerebral ischemia. *FASEB J.* 28, 4710-8.
- Moraga, A., et al., 2016. Imaging the role of toll-like receptor 4 on cell proliferation and inflammation after cerebral ischemia by positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab.* 36, 702-8.
- Moser, T.L., et al., 1993. The extracellular matrix proteins laminin and fibronectin contain binding domains for human plasminogen and tissue plasminogen activator. *J Biol Chem.* 268, 18917-23.
- Mosser, D.M., 2003. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 73, 209-12.
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 8, 958-69.
- Murikinati, S., et al., 2010. Activation of cannabinoid 2 receptors protects against cerebral ischemia by inhibiting neutrophil recruitment. *FASEB J.* 24, 788-98.
- Mócsai, A., 2013. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med.* 210, 1283-99.
- Möller, K., et al., 2014. Sterile inflammation after permanent distal MCA occlusion in hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 34, 307-15.
- Nacher, M., Hidalgo, A., 2011. Fire within the vessels: interactions between blood cells and inflammatory vascular injury. *Front Biosci (Schol Ed).* 3, 1089-100.
- Nadal, A., et al., 1995. Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 1426-30.
- Nagai, Y., et al., 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol.* 3, 667-72.
- Nagyoszi, P., et al., 2010. Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem Int.* 57, 556-64.
- Nassar, T., et al., 2004. In vitro and in vivo effects of tPA and PAI-1 on blood vessel tone. *Blood.* 103, 897-902.
- Nathan, C., Ding, A., 2010. Nonresolving inflammation. *Cell.* 140, 871-82.

- Neumann, J., et al., 2015. Very-late-antigen-4 (VLA-4)-mediated brain invasion by neutrophils leads to interactions with microglia, increased ischemic injury and impaired behavior in experimental stroke. *Acta Neuropathol.* 129, 259-77.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F., 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 308, 1314-8.
- Nischwitz, V., Berthele, A., Michalke, B., 2008. Speciation analysis of selected metals and determination of their total contents in paired serum and cerebrospinal fluid samples: An approach to investigate the permeability of the human blood-cerebrospinal fluid-barrier. *Anal Chim Acta.* 627, 258-69.
- Nordenfelt, P., Tapper, H., 2010. The role of calcium in neutrophil granule-phagosome fusion. *Commun Integr Biol.* 3, 224-6.
- Norrving, B., Kissela, B., 2013. The global burden of stroke and need for a continuum of care. *Neurology.* 80, S5-12.
- Northcutt, A.L., et al., 2015. DAT isn't all that: cocaine reward and reinforcement require Toll-like receptor 4 signaling. *Mol Psychiatry.* 20, 1525-37.
- Nourshargh, S., Hordijk, P.L., Sixt, M., 2010. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11, 366-78.
- O'Collins, V.E., et al., 2006. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol.* 59, 467-77.
- O'Connor, J.C., et al., 2009. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry.* 14, 511-22.
- O'Donnell, M.J., et al., 2010. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet.* 376, 112-23.
- O'Mahony, D.S., et al., 2008. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int J Med Sci.* 5, 1-8.
- O'Neill, L.A., Bowie, A.G., 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 7, 353-64.
- Offner, H., et al., 2006. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26, 654-65.
- Ohtaki, H., et al., 2008. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 14638-43.
- Oldendorf, W.H., Cornford, M.E., Brown, W.J., 1977. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol.* 1, 409-17.
- Olmez, I., Ozyurt, H., 2012. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. *Neurochem Int.* 60, 208-12.
- Olson, J.K., Miller, S.D., 2004. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol.* 173, 3916-24.
- Orset, C., et al., 2007. Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke.* 38, 2771-8.
- Orset, C., et al., 2016. Efficacy of Alteplase in a Mouse Model of Acute Ischemic Stroke: A Retrospective Pooled Analysis. *Stroke.* 47, 1312-8.
- Ortega, S.B., et al., 2015. Stroke induces a rapid adaptive autoimmune response to novel neuronal antigens. *Discov Med.* 19, 381-92.
- Park, B.S., et al., 2009. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature.* 458, 1191-5.

- Partida-Sánchez, S., et al., 2001. Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat Med.* 7, 1209-16.
- Partidá-Sánchez, S., et al., 2007. CD38: an ecto-enzyme at the crossroads of innate and adaptive immune responses. *Adv Exp Med Biol.* 590, 171-83.
- Pelidou, S.H., et al., 1999. High levels of IL-10 secreting cells are present in blood in cerebrovascular diseases. *Eur J Neurol.* 6, 437-42.
- Peppiatt, C.M., et al., 2006. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature.* 443, 700-4.
- Perego, C., Fumagalli, S., De Simoni, M.G., 2011. Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *J Neuroinflammation.* 8, 174.
- Pernhorst, K., et al., 2013. TLR4, ATF-3 and IL8 inflammation mediator expression correlates with seizure frequency in human epileptic brain tissue. *Seizure.* 22, 675-8.
- Pfeilschifter, W., et al., 2012. Thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator under dabigatran anticoagulation in experimental stroke. *Ann Neurol.* 71, 624-33.
- Pham, C.T., 2006. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 6, 541-50.
- Piccinini, A.M., Midwood, K.S., 2010. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm.* 2010.
- Pillay, J., et al., 2012. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest.* 122, 327-36.
- Plotnikov, A., et al., 2011. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta.* 1813, 1619-33.
- Poltorak, A., et al., 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 282, 2085-8.
- Pradillo, J.M., et al., 2009. Toll-like receptor 4 is involved in neuroprotection afforded by ischemic preconditioning. *J Neurochem.* 109, 287-94.
- Prestigiacomo, C.J., et al., 1999. CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke. *Stroke.* 30, 1110-7.
- Price, C.J., et al., 2004. Cerebral neutrophil recruitment, histology, and outcome in acute ischemic stroke: an imaging-based study. *Stroke.* 35, 1659-64.
- Puellmann, K., et al., 2006. A variable immunoreceptor in a subpopulation of human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 14441-6.
- Pulsinelli, W., 1992. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet.* 339, 533-6.
- Pösel, C., et al., 2014. Flow cytometric characterization of brain dendritic cell subsets after murine stroke. *Exp Transl Stroke Med.* 6, 11.
- Qian, Z., et al., 1993. Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature.* 361, 453-7.
- Qiu, J., et al., 2008. Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28, 927-38.
- Qiu, J., et al., 2010. High-mobility group box 1 promotes metalloproteinase-9 upregulation through Toll-like receptor 4 after cerebral ischemia. *Stroke.* 41, 2077-82.
- Raes, G., et al., 2005. Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. *J Immunol.* 174, 6561; author reply 6561-2.
- Reese, T.S., Karnovsky, M.J., 1967. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol.* 34, 207-17.
- Reichmann, G., et al., 2002. Dendritic cells and dendritic-like microglia in focal cortical ischemia of the mouse brain. *J Neuroimmunol.* 129, 125-32.
- Rha, J.H., Saver, J.L., 2007. The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke.* 38, 967-73.

- Ridley, A.J., et al., 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 302, 1704-9.
- Rijken, D.C., Hoylaerts, M., Collen, D., 1982. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J Biol Chem*. 257, 2920-5.
- Rijken, D.C., 1995. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin Haematol*. 8, 291-312.
- Ringelstein, E.B., et al., 2013. European Stroke Organisation recommendations to establish a stroke unit and stroke center. *Stroke*. 44, 828-40.
- Rolls, A., et al., 2007. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol*. 9, 1081-8.
- Ronaldson, P.T., Davis, T.P., 2012. Blood-brain barrier integrity and glial support: mechanisms that can be targeted for novel therapeutic approaches in stroke. *Curr Pharm Des*. 18, 3624-44.
- Rosamond, W., et al., 2008. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 117, e25-146.
- Rosell, A., et al., 2006. Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke*. 37, 1399-406.
- Rosell, A., et al., 2008. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke*. 39, 1121-6.
- Rosenberg, G.A., Estrada, E.Y., Dencoff, J.E., 1998. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*. 29, 2189-95.
- Rosenberg, G.A., 2002. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia*. 39, 279-91.
- Sanderson, T.H., et al., 2013. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Mol Neurobiol*. 47, 9-23.
- Sandoval, K.E., Witt, K.A., 2008. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis*. 32, 200-19.
- Sansing, L.H., et al., 2011. Toll-like receptor 4 contributes to poor outcome after intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol*. 70, 646-56.
- Saqqur, M., et al., 2008. Symptomatic intracerebral hemorrhage and recanalization after IV rt-PA: a multicenter study. *Neurology*. 71, 1304-12.
- Sauer, R.S., et al., 2014. Toll like receptor (TLR)-4 as a regulator of peripheral endogenous opioid-mediated analgesia in inflammation. *Mol Pain*. 10, 10.
- Saver, J.L., et al., 2010. The "golden hour" and acute brain ischemia: presenting features and lytic therapy in >30,000 patients arriving within 60 minutes of stroke onset. *Stroke*. 41, 1431-9.
- Saver, J.L., et al., 2015. Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med*. 372, 2285-95.
- Savitz, J., et al., 2015. Reduction of kynurenic acid to quinolinic acid ratio in both the depressed and remitted phases of major depressive disorder. *Brain Behav Immun*. 46, 55-9.
- Scheffold, A., Murphy, K.M., Höfer, T., 2007. Competition for cytokines: T(reg) cells take all. *Nat Immunol*. 8, 1285-7.
- Schilling, M., et al., 2005. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol*. 196, 290-7.

- Schwab, J.M., et al., 2001. Human focal cerebral infarctions induce differential lesional interleukin-16 (IL-16) expression confined to infiltrating granulocytes, CD8+ T-lymphocytes and activated microglia/macrophages. *J Neuroimmunol.* 114, 232-41.
- Segel, G.B., Halterman, M.W., Lichtman, M.A., 2011. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol.* 89, 359-72.
- Shaul, M.E., et al., 2016. Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGF β modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs. *Oncoimmunology.* 5, e1232221.
- Shechter, R., et al., 2009. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med.* 6, e1000113.
- Shi, C., Pamer, E.G., 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 11, 762-74.
- Shi, J., et al., 2001. Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood.* 98, 1226-30.
- Shichita, T., et al., 2012. Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke. *J Neurochem.* 123 Suppl 2, 29-38.
- Shichita, T., Ito, M., Yoshimura, A., 2014. Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection. *Front Cell Neurosci.* 8, 319.
- Shimazu, R., et al., 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 189, 1777-82.
- Siao, C.J., Fernandez, S.R., Tsirka, S.E., 2003. Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. *J Neurosci.* 23, 3234-42.
- Siesjö, B.K., Agardh, C.D., Bengtsson, F., 1989. Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1, 165-211.
- Sodhi, C.P., et al., 2012. Intestinal epithelial Toll-like receptor 4 regulates goblet cell development and is required for necrotizing enterocolitis in mice. *Gastroenterology.* 143, 708-18.e1-5.
- Spite, M., Serhan, C.N., 2010. Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. *Circ Res.* 107, 1170-84.
- Squier, M.K., et al., 1999. Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. *J Cell Physiol.* 178, 311-9.
- Sreeramkumar, V., et al., 2014. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science.* 346, 1234-8.
- Stamatovic, S.M., et al., 2005. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25, 593-606.
- Steiner, T., et al., 1998. The ECASS 3-hour cohort. Secondary analysis of ECASS data by time stratification. ECASS Study Group. European Cooperative Acute Stroke Study. *Cerebrovasc Dis.* 8, 198-203.
- Stence, N., Waite, M., Dailey, M.E., 2001. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia.* 33, 256-66.
- Stevens, S.L., et al., 2002. The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* 932, 110-9.
- Strickland, S., 2001. Tissue plasminogen activator in nervous system function and dysfunction. *Thromb Haemost.* 86, 138-43.
- Stubbe, T., et al., 2013. Regulatory T cells accumulate and proliferate in the ischemic hemisphere for up to 30 days after MCAO. *J Cereb Blood Flow Metab.* 33, 37-47.
- Sumii, T., Lo, E.H., 2002. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke.* 33, 831-6.

- Summers, C., et al., 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 31, 318-24.
- Sun, J., Nan, G., 2016. The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Signaling Pathway as a Discovery Target in Stroke. *J Mol Neurosci.* 59, 90-8.
- Sutherland, B.A., et al., 2012. Neuroprotection for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside. *Int J Stroke.* 7, 407-18.
- Suzuki, H., et al., 1999. Anti-P-selectin antibody attenuates rat brain ischemic injury. *Neurosci Lett.* 265, 163-6.
- Tada, S., et al., 2011. Deleterious effects of lymphocytes at the early stage of neurodegeneration in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation.* 8, 19.
- Takano, T., et al., 2009. Astrocytes and ischemic injury. *Stroke.* 40, S8-12.
- Takeda, K., Akira, S., 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 17, 1-14.
- Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 140, 805-20.
- Tang, S.C., et al., 2007. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 13798-803.
- Tang, S.C., et al., 2008. Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Exp Neurol.* 213, 114-21.
- Tang, S.C., et al., 2013. Evidence for a detrimental role of TLR8 in ischemic stroke. *Exp Neurol.* 250, 341-7.
- Tanimura, N., et al., 2008. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 368, 94-9.
- Tarassishin, L., Suh, H.S., Lee, S.C., 2011. Interferon regulatory factor 3 plays an anti-inflammatory role in microglia by activating the PI3K/Akt pathway. *J Neuroinflammation.* 8, 187.
- Taylor, S.E., et al., 2014. Rod microglia: a morphological definition. *PLoS One.* 9, e97096.
- Teng, W., et al., 2009. Activation of TLR4-mediated NFkappaB signaling in hemorrhagic brain in rats. *Mediators Inflamm.* 2009, 473276.
- Terént, A., et al., 2009. Stroke unit care revisited: who benefits the most? A cohort study of 105,043 patients in Riks-Stroke, the Swedish Stroke Register. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 80, 881-7.
- Tobias, P.S., et al., 1995. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem.* 270, 10482-8.
- Triantafilou, M., et al., 2002. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci.* 115, 2603-11.
- Trotta, T., et al., 2014. Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain. *J Neuroimmunol.* 268, 1-12.
- Tsirka, S.E., et al., 1997. An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J Neurosci.* 17, 543-52.
- Turner, R.C., et al., 2013. The science of cerebral ischemia and the quest for neuroprotection: navigating past failure to future success. *J Neurosurg.* 118, 1072-85.
- Urra, X., et al., 2009a. Monocytes are major players in the prognosis and risk of infection after acute stroke. *Stroke.* 40, 1262-8.
- Urra, X., et al., 2009b. Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29, 994-1002.
- Vivien, D., et al., 2011. Impact of tissue plasminogen activator on the neurovascular unit: from clinical data to experimental evidence. *J Cereb Blood Flow Metab.* 31, 2119-34.
- Wagner, D.D., Frenette, P.S., 2008. The vessel wall and its interactions. *Blood.* 111, 5271-81.

- Wakisaka, Y., et al., 2010. Spontaneous intracerebral hemorrhage during acute and chronic hypertension in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30, 56-69.
- Wang, L., et al., 2014. Protective effect of shikonin in experimental ischemic stroke: attenuated TLR4, p-p38MAPK, NF- κ B, TNF- α and MMP-9 expression, up-regulated claudin-5 expression, ameliorated BBB permeability. *Neurochem Res.* 39, 97-106.
- Wang, Q., Tang, X.N., Yenari, M.A., 2007. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol.* 184, 53-68.
- Wang, W., et al., 2015. Hemorrhagic Transformation after Tissue Plasminogen Activator Reperfusion Therapy for Ischemic Stroke: Mechanisms, Models, and Biomarkers. *Mol Neurobiol.* 52, 1572-9.
- Wang, X., et al., 2003. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med.* 9, 1313-7.
- Wang, X., Lo, E.H., 2003. Triggers and mediators of hemorrhagic transformation in cerebral ischemia. *Mol Neurobiol.* 28, 229-44.
- Wang, Y.C., et al., 2013. Toll-like receptor 4 antagonist attenuates intracerebral hemorrhage-induced brain injury. *Stroke.* 44, 2545-52.
- Wardlaw, J.M., et al., 2012. Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 379, 2364-72.
- Wattananit, S., et al., 2016. Monocyte-Derived Macrophages Contribute to Spontaneous Long-Term Functional Recovery after Stroke in Mice. *J Neurosci.* 36, 4182-95.
- Weber, C., Fraemohs, L., Dejana, E., 2007. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol.* 7, 467-77.
- Wiemer, A.J., et al., 2010. Calpain inhibition impairs TNF-alpha-mediated neutrophil adhesion, arrest and oxidative burst. *Mol Immunol.* 47, 894-902.
- Willing, A.E., 2009. Experimental models: help or hindrance. *Stroke.* 40, S152-4.
- Woodfin, A., et al., 2011. Acute NADPH oxidase activation potentiates cerebrovascular permeability response to bradykinin in ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 50, 518-24.
- Xi, G., Reiser, G., Keep, R.F., 2003. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? *J Neurochem.* 84, 3-9.
- Xiong, X., et al., 2013. The protective effects of T cell deficiency against brain injury are ischemic model-dependent in rats. *Neurochem Int.* 62, 265-70.
- Yan, X., Jiang, E., Weng, H.R., 2015. Activation of toll like receptor 4 attenuates GABA synthesis and postsynaptic GABA receptor activities in the spinal dorsal horn via releasing interleukin-1 beta. *J Neuroinflammation.* 12, 222.
- Yang, J., et al., 1999. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med.* 190, 1769-82.
- Yang, Q.W., et al., 2008. Upregulated expression of toll-like receptor 4 in monocytes correlates with severity of acute cerebral infarction. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28, 1588-96.
- Yang, Q.W., et al., 2010. High-mobility group protein box-1 and its relevance to cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30, 243-54.
- Yang, Q.W., et al., 2011. HMBG1 mediates ischemia-reperfusion injury by TRIF-adaptor independent Toll-like receptor 4 signaling. *J Cereb Blood Flow Metab.* 31, 593-605.
- Yang, Y., Rosenberg, G.A., 2011. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke.* 42, 3323-8.
- Ye, Y., et al., 2014. Association between toll-like receptor 4 expression and neural stem cell proliferation in the hippocampus following traumatic brain injury in mice. *Int J Mol Sci.* 15, 12651-64.

- Yenari, M.A., Han, H.S., 2012. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci.* 13, 267-78.
- Yepes, M., et al., 2003. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest.* 112, 1533-40.
- Yepes, M., Lawrence, D.A., 2004. New functions for an old enzyme: nonhemostatic roles for tissue-type plasminogen activator in the central nervous system. *Exp Biol Med* (Maywood). 229, 1097-104.
- Yilmaz, G., et al., 2006. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation.* 113, 2105-12.
- Yilmaz, G., Granger, D.N., 2008. Cell adhesion molecules and ischemic stroke. *Neurol Res.* 30, 783-93.
- Young, A.R., et al., 2007. Neuroprotection and stroke: time for a compromise. *J Neurochem.* 103, 1302-9.
- Zan, L., et al., 2014. Src regulates angiogenic factors and vascular permeability after focal cerebral ischemia-reperfusion. *Neuroscience.* 262, 118-28.
- Zarruk, J.G., et al., 2012. Cannabinoid type 2 receptor activation downregulates stroke-induced classic and alternative brain macrophage/microglial activation concomitant to neuroprotection. *Stroke.* 43, 211-9.
- Zhang, D., et al., 2015. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature.* 525, 528-32.
- Zhang, L., et al., 2003. Effects of a selective CD11b/CD18 antagonist and recombinant human tissue plasminogen activator treatment alone and in combination in a rat embolic model of stroke. *Stroke.* 34, 1790-5.
- Zhang, L., Zhang, Z.G., Chopp, M., 2012. The neurovascular unit and combination treatment strategies for stroke. *Trends Pharmacol Sci.* 33, 415-22.
- Zhang, X., et al., 2009. Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity.* 31, 761-71.
- Zhou, H., et al., 2006. A requirement for microglial TLR4 in leukocyte recruitment into brain in response to lipopolysaccharide. *J Immunol.* 177, 8103-10.
- Zhou, H., et al., 2009. Role of endothelial TLR4 for neutrophil recruitment into central nervous system microvessels in systemic inflammation. *J Immunol.* 183, 5244-50.
- Ziebell, J.M., et al., 2012. Rod microglia: elongation, alignment, and coupling to form trains across the somatosensory cortex after experimental diffuse brain injury. *J Neuroinflammation.* 9, 247.
- Zlokovic, B.V., 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* 57, 178-201.

ANEXOS

Símbolo del gen	Valor SD
egr2	1,9846
saa3	1,9456
stfa3	1,7083
cmc2	1,5319
mmp19	1,5137
tmem181b-ps	1,4961
cirh1a	1,463
cxcl2	1,4561
orm1	1,4552
cd38	1,3968
art2a-ps	1,3458
tubb1	1,3272
ikbke	1,3015
gm7647	1,2533
gm25728	1,2348
ngp	1,2223
bc117090	1,2081
mmrn1	1,1879
ecm1	1,1432
ccl3	1,1289
olfr777	1,1244
pus7	1,1114
pou2f2	1,1087
gm13285	1,1031
psmd3	1,0991
chil3	1,0727
mir146	1,0568
gm22085	0,9994
mir3108	0,9964
snx25	0,9843
sntb2	0,9717
1700003g13rik	0,9661
id2	0,9597
ubxn11	0,9571
mlkl	0,9484
stfa2	0,948
neu3	0,9457
gpr84	0,9371
gm5416	0,9279
lacc1	0,926
mdm1	0,9243
igkv12-38	0,9206
exosc3	0,919
2010005h15rik	0,9168

c1s1	0,9136
chn1	0,9124
adamtsl4	0,9107
erdr1	0,9102
slc25a2	0,8991
spata13	0,8972
loc102633225	0,8878
crispld2	0,8834
loc105245440	0,8827
ccrl2	0,8781
nr4a1	0,8774
sdr9c7	0,875
adgre4	0,8743
mir652	0,8728
rilpl2	0,8657
btbd10	0,8611
stfa1	0,859
samd12	0,848
cd300e	0,8429
gm14280	0,8404
e130215h24rik	0,8329
n-r5s192	0,8224
anxa6	0,8191
tnfaip3	0,8107
klhl6	0,8055
clec4a1	0,8016
gm8234	0,8001
gm2964	0,7894
cped1	0,7889
arhgap44	0,7884
slc25a47	0,7861
dynlt1a	0,7834
cebpz	0,7829
il1a	0,7808
snip1	0,7796
ace	0,7651
gm23061	0,7565
clec4a4	0,7564
f11r	0,7511
itgb2l	0,7501
nsmce2	0,742
otub2	0,7405
slc2a10	0,7403
olfm4	0,7392
4930438a08rik	0,7391
gimap1	0,7367

fcgr2b	0,7326
prkag2os2	0,732
nme9	0,7268
pafah1b1	0,7259
vmn2r68	0,7221
slc39a4	0,7215
gm3594	0,7195
gm25654	0,7195
per1	0,7173
fosb	0,7159

Anexo 1. Lista de los 100 genes que presentan una mayor desviación estándar.